



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

Ohanna Cavalcanti de Lima Bezerra

Análise de polimorfismos no gene *PKLR* e associação com a hanseníase

Orientadores: Prof. Dr. Milton Ozório Moraes
Prof. Dr. Antonio Guilherme Pacheco

RIO DE JANEIRO

2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

B574 Bezerra, Ohanna Cavalcanti de Lima

Análise de polimorfismos no gene PKLR e associação com a hanseníase / Ohanna Cavalcanti de Lima Bezerra. – Rio de Janeiro, 2015.

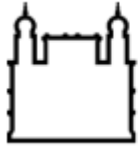
xx,136 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2015.

Bibliografia: f. 101-127

1. Hanseníase. 2. Polimorfismos. 3. PKLR. 4. Ferro. I. Título.

CDD 616.998



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

Ohanna Cavalcanti de Lima Bezerra

Análise de polimorfismos no gene PKLR e associação com a hanseníase

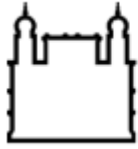
Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientadores: Prof. Dr. Milton Ozório Moraes
Prof. Dr. Antonio Guilherme Pacheco

RIO DE JANEIRO

2015

iii



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

Autora: Ohanna Cavalcanti de Lima Bezerra

Análise de polimorfismos no gene PKLR e associação com a hanseníase

Orientadores: Prof. Dr. Milton Ozório Moraes
Prof. Dr. Antonio Guilherme Pacheco

Aprovada em: 25/09/2015

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Adalberto Rezende Santos / Instituto Oswaldo Cruz- RJ

Prof. Dra. Roberta Olmo Pinheiro / Instituto Oswaldo Cruz- RJ

Prof. Dra. Leonor Gusmão / Universidade Estadual do Rio de Janeiro

SUPLENTE:

Prof. Dr. Flávio Alves Lara / Instituto Oswaldo Cruz- RJ

Prof. Dra. Carolinne de Sales Marques / Instituto Oswaldo Cruz- RJ

REVISOR(A):

Prof. Dra. Cynthia Chester Cardoso / Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro, setembro de 2015.

“Seja aquilo que você quer ver no mundo”

Mahatma Gandhi.

À minha família, que com muito amor, sempre me incentivou a lutar pelos meus sonhos.

Agradecimentos

A Deus, por me fortalecer e guiar em todo o caminho traçado até aqui.

Aos meus pais e irmão, Denise, Amilton e Hallan, pelo amor, carinho e por encorajarem minha profissão e me dar tanto amor e segurança.

Ao meu padrasto, Thomas Schwalm, que me proporcionou novos horizontes e conhecimento. Obrigada por tudo!

Aos meus avós, Maria e Manoel, meus exemplos e grandes responsáveis pela minha formação. Vocês são minha inspiração!

Ao meu amor, Leandro, pela força, compreensão, paciência e companheirismo.

À minha família, que mesmo com a distância, sempre esteve perto, me dando forças e acreditando no meu sucesso.

Ao meu orientador, Milton Ozório Moraes, pelo incentivo, ensinamento e confiança. Agradeço imensamente a oportunidade da orientação e do desenvolvimento deste projeto no laboratório que tanto gosto.

Ao meu orientador, Antonio Guilherme Pacheco, pela disponibilidade e por me ajudar a desenvolver e interpretar as análises estatísticas e desenhos de estudo, além de contribuir muito nas minhas discussões.

A Lucia Elena, que foi minha co-orientadora durante a iniciação científica, e a Carolinne Marques, pelas inúmeras contribuições e por me acompanharem desde o início e participarem diretamente da minha formação ao longo desses anos.

À Dra. Roberta Olmo, por auxiliar na colaboração das dosagens hematológicas, possibilitando a análise em amostras de pacientes.

Ao Dr. Mauro Sola-Penna, pela grande ajuda nos ensaios de atividade enzimática e discussão dos resultados que enriqueceram este trabalho.

Ao Alex (Ambulatório Souza Araújo) e demais colegas que auxiliaram na coleta de amostras de sangue. Agradeço também a todos aos voluntários deste trabalho.

Aos demais colegas de laboratório (LAHAN), indispensáveis para o desenvolvimento de tal trabalho, Fernanda Kehdy (pela colaboração formada e pelas ricas discussões em genética), Fernanda Manta (pelo aprendizado acerca de ancestralidade), Rychelle (pela ajuda indispensável nos ensaios enzimáticos), Suellen, Brunna, Paula, Caroline Xavier, Thiago, Leonardo, Alexandre, Elis, Alana, Valcemir, Yerly, Renuka, Priscilla, Rafaela, Isabelle pela amizade e alegria que compartilhamos. Cito ainda aqueles que já não fazem parte do laboratório, mas também foram imprescindíveis na minha formação até aqui, Ana Beatriz (Xuxu), Tiana, Luana, Livia e Anelize pela adorável convivência. Agradeço aos demais membros deste grupo pelos incontáveis momentos de descontração, paciência e dedicação.

Aos colegas dos laboratórios vizinhos e integrantes do Ambulatório Souza Araújo, que possibilitaram o uso de amostras/equipamentos e também contribuíram para o sucesso dos experimentos.

Aos meus amigos da UNIRIO, grata pela ajuda mútua e companheirismo desde a graduação.

Ao Laboratório Sérgio Franco, pelo auxílio no estudo funcional.

À Cynthia Chester, pelo apoio e revisão cuidadosa deste trabalho.

A todos os companheiros do pavilhão de hanseníase, que mantiveram uma convivência tranquila e sempre estiveram dispostos a ajudar no que fosse preciso.

Ao Programa de Biologia Celular e Molecular e aos professores que contribuíram para a minha formação acadêmica.

Às agências de fomento CAPES, IOC e FAPERJ, pelo suporte financeiro que possibilitaram o andamento e finalização dessa dissertação.

Sumário

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos.....	xii
Lista de figuras	xvii
Lista de tabelas	xix
Resumo	xx
Abstract.....	xxi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 - Hanseníase	2
1.1.1 - Modelo de estudo	2
1.1.2 - Histórico	3
1.1.3 - Epidemiologia	4
1.1.4 - Agente etiológico	6
1.1.5 - Classificação da hanseníase	8
1.1.6 - Transmissão.....	11
1.1.7 - Diagnóstico e tratamento	12
1.1.8 - Estratégia de estudo genético em hanseníase.....	14
1.1.9 - Genes associados à hanseníase.....	17
1.1.9.1 - Resposta imune inata.....	17
1.1.9.2 - Resposta imune adaptativa.....	21
1.2 - Importância do ferro na infecção por patógenos intracelulares	23
1.2.1 - Homeostase de ferro no organismo humano	23
1.2.2 - Captação de ferro frente a infecção por patógenos intracelulares.....	25
1.2.3 - Metabolismo de ferro por micobactérias.....	26
1.2.4 - Modulação de ferro para o <i>Mycobacterium leprae</i>	28
1.3 - O <i>PKLR</i>	30
1.3.1 - Piruvato quinase	30
1.3.2 - Mutações no <i>PKLR</i>	32
1.3.3 - Polimorfismos no <i>PKLR</i> e predisposição a doenças infecciosas.....	33
1.4 - Tuberculose	34
2 - JUSTIFICATIVA.....	37
3 - OBJETIVOS.....	40
3.1 – Objetivo geral	40
3.2 – Objetivos específicos.....	40
4 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1 – Desenho de estudo.....	43

4.2 – Análise <i>in silico</i> – Seleção de SNPs por desequilíbrio de ligação (LD)	44
4.3 – Grupo amostral	45
4.3.1 – Estudo caso-controle do Rio de Janeiro	45
4.3.2 – Estudo caso-controle de Moçambique	47
4.3.3 – Amostras de sequenciamento	48
4.3.4 – Amostras do ensaio funcional.....	48
4.3.5 – Considerações éticas.....	49
4.4 – Estudo de associação	49
4.4.1 – Extração de DNA.....	49
4.4.2 – Quantificação de DNA	50
4.4.3 – Genotipagem por PCR em tempo real.....	50
4.4.4 – Análise estatísticas.....	52
4.5 – Análise de sequenciamento	53
4.5.1 – PCR convencional	53
4.5.2 – Eletroforese em gel de agarose.....	54
4.5.3 – Purificação do produto de PCR	54
4.5.4 – Reação de sequenciamento.....	54
4.5.5 – Análise dos eletroferogramas	55
4.6 – Dosagens hematológicas.....	55
4.6.1 – Coleta e processamento de sangue total	55
4.6.2 – Dosagem de ferro sérico, TIBC, índice de saturação da transferrina, ferritina e haptoglobina.....	56
4.7 – Atividade enzimática	56
4.7.1 – Separação de células.....	56
4.7.2 – Leitura de atividade da PK	57
4.7.3 – Quantificação de proteínas	58
4.7.4 – Análises estatísticas	58
5 – RESULTADOS	59
5.1 – Seleção de SNPs por sequenciamento	60
5.2 – Estudo de associação	63
5.2.1 – Associação dos polimorfismos do <i>PKLR</i> com a suscetibilidade à hanseníase.....	63
5.2.2 – Associação dos polimorfismos do <i>PKLR</i> com a tuberculose	70
5.3 – Análise funcional.....	73
5.3.1 – Caracterização dos níveis séricos de ferro, ferritina, TIBC e índice de	

saturação da transferrina em função dos genótipos	73
5.3.2 – Caracterização dos níveis de haptoglobina em indivíduos saudáveis e pacientes	80
5.3.3 – Análise da atividade da piruvato quinase (PK)	86
6 – DISCUSSÃO	88
7 – CONCLUSÃO	99
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
9 – ANEXOS.....	128
Anexo 1 - Mapa de LD nas populações CEU e YRI.....	129
Anexo 2 - Parecer do comitê de ética 170/2012.....	132
Anexo 3 - Termo de consentimento livre e esclarecido (RJ)	133
Anexo 4 - Parecer do comitê de ética 140/11	135
Anexo 5 - Termo de consentimento livre e esclarecido (Moçambique)	136

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

°C	Graus Celsius
r ²	Coeficiente de correlação
X ²	Qui quadrado
a.C.	Antes de Cristo
Ag	Antígeno
A	Adenina
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
BCA	Ensaio BCA, do inglês “Bicinchoninic acid assay”
BCG	Bacilo de Calmette e Guérin
BB	Boderline-boderline
BL	Boderline lepromatoso
Brf	Bacterioferritina
BT	Boderline tuberculóide
C	Citosina
<i>CCDC122</i>	Gene cuja sigla vem do inglês, “coiled-coil domain containing 122”
CD	Do inglês, “cluster of differentiation”
CEU	População do HapMap representativa de ascendência europeia
CNV	Do inglês, “ <i>copy number variantios</i> ”
CO	Monóxido de carbono
<i>CUBN</i>	Gene que codifica a cubulina
dbSNP	Do inglês, “SNPs data base”
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
Dcytb	Enzima redutase citocromo b duodenal, do inglês “Duodenal cytochrome b”
DMT-1	Proteína transportadora de metal divalente, do inglês “divalent metal transporter 1”
DNA	Ácido desoxiribonucléico
DPG	2,3-difosfoglicerato

EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	do inglês, “Enzyme-linked immunosorbent assay”
ENH	Eritema nodoso hansênico
EUA	Estados Unidos da América
Fe	Ferro
FeS	Sulfato ferroso
FPT	Ferroportina
Fur	Do inglês, “ferric uptake regulation”
G	Guanina
G6DP	Glicose-fosfato
GWAS	do inglês, “Genome-wide association study”
h	horas
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
Hb	Hemoglobina
Hp	Haptoglobina
HCl	Ácido Clorídrico
HCP1	do inglês, “Haem carrier protein 1”
HLA	Antígeno leucocitário humano
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HO-1	Heme-oxigenase-1
HWE	Equilíbrio de Herdy-Weimberg
I	Forma indeterminada da hanseníase
ideR	Gene regulador de ferro, do inglês “iron-dependent”
IDRI	Infectious Disease Research Institute
IFNG	Gene que codifica o Interferon-gama
IFN γ	Interferon gama
IgM	Imunoglobulina M
IGRA	Do inglês, “Interferon-gamma release assay”
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IrtAB	Do inglês, “Iron transporter”
Ity4	locus de suscetibilidade a <i>S. typhimurium</i> , do inglês “Immunity to

	S. typhimurium 4”
K ⁺	Íon potássio
KatG	Gene que codifica a peroxidase, do inglês “Catalase-peroxidase”
kDa	Kilodaltons
KCl	Cloreto de potássio
LAC	Gene que codifica o operon lac
LAM	Lipoarabinomanana
LD	Desequilíbrio de ligação, do inglês “Linkage disequilibrium”
LDH	Lactato desidrogenase
LID-1	Antígeno recombinante, do inglês “leprosy IDRI diagnostic”
LL	lepromatoso
LTA	Gene que codifica linfotoxina
M	Molar
M.	Mycobacterium
Mb	Megabase
MB	Multibacilar
MDR	Multi-droga resistentes
mg	Miligrama
Mg ²⁺	Íon magnésio
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
miRNA	microRNA
mL	Mililitro
Mn ²⁺	Íon manganês
MR	Receptor de manose
<i>MRC1</i>	Gene que codifica o receptor de manose, do inglês “Mannose receptor C type 1”
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NaCl	Cloreto de sódio
NAD	Dinucleotídeo nicotinamida e adenina
NCBI	Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia
<i>NEBL</i>	Gene que codifica nebulina
NF-kB	Fator nuclear kappa B
Ng	Nanograma

nM	Nanomolar
<i>NOD</i>	gene que codifica o receptor NOD, do inglês “Nucleotide-binding Oligomerization Domain Receptor”
NP	Forma neural pura
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	<i>Odds ratio</i> (razão de chances)
pb	Pares de base
<i>PACRG</i>	Gene que compartilha o promotor do gene PARK2, do inglês “Parkin co-regulated gene”
PAMP	Padrões Moleculares Associados a Patógenos, do inglês “Pathogen-associated molecular patterns”
PARK2	Gene que codifica a proteína parkina
PB	Paucibacilar
PBMC	Célula Mononuclear do Sangue Periférico, do inglês “Peripheral Blood Mononucleated Cell”
PBS	Tampão salina fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEP	Fosfoenolpiruvato
PGL-1	Glicolípídeo fenólico-1
pH	Potencial hidrogeniônico
PK	Piruvato quinase
<i>PKM</i>	Gene que codifica a piruvato quinase do músculo, do inglês “Muscle PK”
PKL	Piruvato quinase do fígado, do inglês “Liver PK”
<i>PKLR</i>	Gene que codifica a piruvato quinase do fígado e eritrócitos, do inglês “PYRIvate Kinase Liver and Red blood cells”
PKR	Piruvato quinase dos eritrócitos, do inglês “Red blood cell PK”
PPD	Do inglês, “protein purified derivative”
PRR	Receptor de reconhecimento de padrões, do inglês “Pattern recognition receptor”
PQT	Poliqumioterapia
<i>RIPK2</i>	Gene que codifica o receptor de interação serina-treonina kinase 2, do inglês “Receptor-interacting serine-threonine kinase 2”

RNA	Ácido ribonucleico
RLEP	Elemento repetitivo específico do <i>M. leprae</i>
ROS	Espécies reativas de oxigênio, do inglês “Reactive oxygen species”
rpm	Rotações por minuto
RR	Reação reversa
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Sinan	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SNP	Polimorfismo de base única, do inglês “single nucleotide polymorphisms”
sodA	Gene que codifica superóxido dismutase
STR	Sequência de repetições em tandem, do inglês “Short tandem repeats”
tag	Etiqueta
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Th	Célula T auxiliar
TGF-β	Fator de crescimento e transformação beta, do inglês “Transforming growth factor beta”
TB	Tuberculose
TDT	Teste de Desequilíbrio de Transmissão
TE	Tampão Tris EDTA
TIBC	Capacidade de ligação total do ferro, do inglês “Total iron-binding capacity”
Trf	Transferrina
TNF	Fator de necrose tumoral
TLR	Receptor do tipo Toll, do inglês “Toll-Like Receptor”
TT	Pólo tuberculóide
U	Unidade
UTR	Região não codificante, do inglês “Untranslated region”
V	Volts
VDR	Gene que codifica o receptor de vitamina D, do inglês “Vitamin D receptor”
VNTR	Repetição em tandem de número variável, do inglês “Variable number of tandem repeats”

Lista de figuras

Figura 1.1 - Disseminação da hanseníase no mundo.....	3
Figura 1.2 - Mapa da prevalência da hanseníase no mundo.....	4
Figura 1.3 - Análise da taxa de detecção geral de hanseníase no Brasil no período de 2011-2013.....	5
Figura 1.4 - Distribuição dos genes de <i>M. leprae</i> e <i>M. tuberculosis</i> de acordo com a categoria funcional.....	8
Figura 1.5 - Patogênese da hanseníase e classificação das formas clínicas.....	10
Figura 1.6 - Estratégias de estudo genético em doenças infecciosas.....	17
Figura 1.7 - Metabolismo do ferro no organismo humano.....	24
Figura 1.8 - Ação da hepcidina na regulação do Ferro em enterócitos e macrófagos.....	25
Figura 1.9 - Modelo de captação de ferro por micobactérias.....	28
Figura 1.10 - Via glicolítica.....	31
Figura 4.1 - Estratégia experimental do estudo.....	44
Figura 4.2 - SNPs selecionados para o estudo de associação do gene <i>PKLR</i>	45
Figura 4.3 - Representação do plot de discriminação alélica do SNP rs11264355.....	52
Figura 4.4 - Etapas do PCR convencional.....	53
Figura 5.1 - Eletroferograma indicando a presença de SNPs no éxon 11 do <i>PKLR</i>	60
Figura 5.2 - Mapa de LD das populações de Santa Isabel do Rio Negro (A), Moçambique (B) e Rio de Janeiro (C).....	62
Figura 5.3 - Desequilíbrio de ligação dos SNPs estudados na população de controles do Rio de Janeiro.....	67
Figura 5.4 - LD dos SNPs de <i>PKLR</i> na população de controles de Moçambique.....	72
Figura 5.5 - Distribuição dos níveis de ferro sérico (mcg/dL) em função dos genótipos por SNP.....	74
Figura 5.6 - Frequência dos níveis de ferro sérico (mcg/dL) por intervalos de concentração em função do genótipo.....	75
Figura 5.7 - Distribuição dos níveis de ferritina (ng/mL) em função dos genótipos por SNP.....	76
Figura 5.8 - Frequência dos níveis de ferritina (ng/mL) por intervalos de concentração em função do genótipo.....	77
Figura 5.9 - Frequência de produtores de ferritina (ng/mL) por intervalos em função dos genótipos majoritários e carreadores de G para o SNP rs11264355.....	78

Figura 5.10 - Distribuição capacidade de total de ligação do ferro à transferrina (mcg/dL) em função dos genótipos por SNP.....	79
Figura 5.11 - Distribuição do índice de saturação da transferrina (%) em função dos genótipos por SNP	80
Figura 5.12 - Distribuição dos níveis de haptoglobina (mg/dL) em função dos genótipos em indivíduos saudáveis	81
Figura 5.13 - Frequência dos níveis de haptoglobina (mg/dL) em indivíduos saudáveis por intervalo em função dos genótipos.....	82
Figura 5.14 - Comparação entre os níveis totais de haptoglobina entre casos e controles.....	83
Figura 5.15 - Distribuição dos níveis de haptoglobina (mg/dL) em função dos genótipos em pacientes	83
Figura 5.16 - Comparação entre os níveis de haptoglobina (mg/dL) em pacientes carreadores do alelo majoritário e homocigotos GG	84
Figura 5.17 - Comparação entre os níveis de haptoglobina (mg/dL) pela combinação dos SNPs rs11264359/rs4971072 em pacientes	85
Figura 5.18 – Frequência dos níveis de haptoglobina (mg/dL) por intervalo de concentração em função da combinação de genótipos rs11264359/rs4971072	85
Figura 5.18 – Frequência dos níveis de haptoglobina (mg/dL) por intervalo de concentração em função da combinação de genótipos rs11264359/rs4971072	86
Figura 5.19 – Atividade enzimática da PK em função da combinação de SNPs rs11264359/rs4971072	87
Figura 6.1 – Mecanismo de sobrevivência micobacteriana na presença de ferro.....	97
Figura 9.1 – Mapa de LD na população CEU (HapMap).....	129
Figura 9.2 – Mapa de LD na população YRI (HapMap).....	130
Figura 9.3 – Mapa de LD na população do Rio de Janeiro	131

Lista de tabelas

Tabela 1.1 – Comparação entre os genomas de <i>M. leprae</i> e <i>M. tuberculosis</i>	7
Tabela 1.2 – Esquema padrão de tratamento da hanseníase.....	14
Tabela 4.1 – Características gerais da população do Rio de Janeiro.	47
Tabela 4.2 – Características gerais da população de Moçambique	48
Tabela 4.3 – Caracterização dos SNPs candidatos para genotipagem em PCR em Tempo Real.....	51
Tabela 4.4 – Características gerais da população de Moçambique	52
Tabela 4.5 – Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores	53
Tabela 4.6 – Meio reacional para a atividade enzimática.....	58
Tabela 5.1 – Frequência dos SNPs identificados no sequenciamento.....	61
Tabela 5.2 – Análise de associação dos SNPs rs11264355 e rs11264359 na população do Rio de Janeiro..	64
Tabela 5.3 – Análise de associação para os SNPs rs4620533, rs4971072, rs8177963 e rs8177970 na população do Rio de Janeiro	66
Tabela 5.4 – Análise de associação de haplótipos na população do Rio de Janeiro.	68
Tabela 5.5 – Análise de associação dos haplótipos rs11264359/rs4971072 na população do Rio de Janeiro	69
Tabela 5.6 – Análise de associação para os SNPs rs11264355, rs11264359, rs4620533 e rs4971072 na população de Moçambique	71
Tabela 5.7 – Análise de associação dos rs11264355/rs11264359/rs4620533/rs4971072 na população de Moçambique	73



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

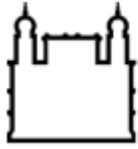
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Análise de polimorfismos no gene *PKLR* e associação com a hanseníase

RESUMO

Ohanna Cavalcanti de Lima Bezerra

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica provocada pelo patógeno intracelular obrigatório *Mycobacterium leprae*. Dado à baixa variabilidade desse bacilo, aliado à variedade de formas clínicas desenvolvidas na hanseníase, sugere-se que o componente genético do hospedeiro é o grande responsável pelo desenvolvimento da doença. Até o momento, polimorfismos de base única (SNPs) em diversos genes foram associados com a predisposição à hanseníase em estudos independentes em diferentes populações. Recentemente, SNPs no gene *PKLR* foram associados ao risco de desenvolvimento da hanseníase pelo nosso grupo. Na tentativa de melhor investigar o efeito de suscetibilidade desse gene a patógenos intracelulares, o presente estudo avaliou a associação de SNPs adicionais do *PKLR* com a hanseníase na população Brasileira e com a tuberculose na população de Moçambique. Os parâmetros funcionais relacionados aos marcadores do *PKLR* também foram avaliados. Inicialmente, foi feita uma seleção de SNPs a partir da busca nos dados do HapMap. Estes SNPs foram genotipados em um estudo de associação seguindo um desenho do tipo caso-controle na população do Rio de Janeiro. Os resultados mostraram uma associação significativa de suscetibilidade a hanseníase para os SNPs rs11264355, rs11264359, rs4620533 e rs4971072 na população do Rio de Janeiro, assim como para o haplótipo rs11264355G/rs11264359G/rs4620533G/rs49710729. Em seguida, os SNPs rs4620533 e rs4971072 foram usados para um segundo estudo de associação do tipo caso-controle em uma população de Moçambique, onde não foi verificada associação com a tuberculose. Paralelamente, foi realizado o sequenciamento do éxon 11 do *PKLR* em populações com diferentes backgrounds genéticos e o perfil de desequilíbrio de ligação destas populações foi caracterizado. O resultado expandiu a análise de SNPs deste trabalho e contribuiu para definir “tag SNPs” ligados aos marcadores de risco. Em seguida, a relação genótipo-fenótipo foi avaliada através da análise de parâmetros sanguíneos e da atividade da enzima piruvato quinase (PK). Os genótipos associados no estudo genético mostraram estar relacionados com o aumento de ferritina em indivíduos saudáveis. Posteriormente, estes genótipos sugeriram associação com o aumento de haptoglobina em indivíduos saudáveis e em pacientes. Por fim, não foram observadas alterações nos níveis de atividade da PK em função dos genótipos. Os achados do presente estudo confirmam a associação genética do *PKLR* com suscetibilidade à hanseníase na população do Rio de Janeiro, assim como sugere a correlação entre os marcadores genéticos e os níveis de ferritina e haptoglobina. O dado genético integrado aos resultados funcionais sugere um potencial efeito biológico que poderia propiciar o risco ao desenvolvimento de doenças por patógenos intracelulares.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Analysys of polymorphins in the *PKLR* gene and association with leprosy

ABSTRACT

Ohanna Cavalcanti de Lima Bezerra

Leprosy is a chronic infectious disease caused by the obligate intracellular pathogen *Mycobacterium leprae*. Given the low variability of the bacile with the variety of clinical phenotype exhibited in leprosy, it is suggested that the genetic componente of the host is responsible to leprosy development. Until now, single nucleotide polymorphisms (SNPs) in many genes were associated with leprosy predisposition in independente studies and population. Recently, SNPs in the *PKLR* gene were associated with leprosy susceptibility by our group. Aiming to investigate the susceptibility to intracellular pathogens, this study evaluated the association of additional SNPs of the *PKLR* in a Brazilian population, followed by an case-control study with tuberculosis in a Mozambique population. Functional parameters correlated to the polymorphic variants were also evaluated. Initially, using the HapMap population data, we performed an analysis to search for SNPs which were tested in an case-control association study. Results showed a significant susceptibility association with leprosy within SNPs rs11264355, rs11264359, rs4620533 and rs4971072 in Rio de Janeiro population. In addition, we demonstrated that the haplotype rs11264355G/rs11264359G/rs4620533G/rs4971072G was significantly associated with leprosy susceptibility in this population. Then SNPs rs4620533 and rs4971072 were tested in a case-control study with a Mozambique population and no association with TB was verified. In parallel, we sequenced the *PKLR* exon 11 in order to seek new SNPs in the region and characterize the linkage disequilibrium profile in populations with different genetic backgrounds. This result has expanded the SNPs analysis of this work and contributed to define "tag SNPs" linked to risk markers. Also the genotype-phenotype relationship was assessed by the analysis of blood parameters and pYRIvate kinase (PK) activity. The genotypes were correlated with increased ferritin and haptoglobin levels in healthy individuals and they were significantly associated with increased haptoglobin in leprosy patients. Posteriorly, no changes were observed in PK activity within the genotypes. This study confirmed the genetic association of *PKLR* with leprosy susceptibility in Rio de Janeiro population. Thus these findings reinforces the genetic association of *PKLR* with leprosy in the population of Rio de Janeiro, as well as identified a correlation between the genetic markers and ferritin and haptoglobin levels. Functional results suggested a potential biological effect of the variants that could provide risk to the development of intracellular pathogens.

1. INTRODUÇÃO

1.1 - Hanseníase

1.1.1 - Modelo de estudo

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica debilitante que apresenta como agente etiológico o *Mycobacterium leprae*. Esse patógeno desenvolve-se preferencialmente nas regiões superficiais do corpo, como a pele e os nervos periféricos (Shepard, 1965). A doença manifesta-se por manchas eritematosas que apresentam limites imprecisos na pele. Essas lesões podem ser acompanhadas de perda de sensibilidade térmica, queda de pêlos e perda de tônus muscular. O acometimento neural pode levar a alteração de sensibilidade. A ausência de tratamento da doença pode, progressivamente, levar à deformação dos membros e danos físicos irreversíveis.

Após a introdução da poliquimioterapia (PQT) pela Organização Mundial de Saúde (OMS) na década de 1980, observou-se uma queda na prevalência da hanseníase no mundo. Atualmente, os índices de detecção permanecem altos pois uma série de obstáculos para o controle da doença ainda são observados. Em torno de 216 mil novos pacientes foram diagnosticados no mundo no ano de 2013, sendo que 30 mil deles ocorrem no Brasil (OMS, 2013). Há dificuldade para o diagnóstico precoce, principalmente nas regiões mais carentes do país. Além disso, a baixa condição socioeconômica da população em contato com os pacientes é um grande problema para se controlar a doença. Aliado a esses fatores, ainda não está claro como ocorre o desenvolvimento da hanseníase. Não existe um mecanismo direto que regule a infecção pelo *M. leprae*. Sabe-se que o desenvolvimento da doença é multifatorial, e muito ainda deve ser estudado para se esclarecer os mecanismos de progressão da doença.

As doenças infecciosas são caracterizadas como doenças complexas, na qual as características do patógeno, a genética do hospedeiro e o ambiente atuam de forma conjunta para o desfecho da infecção (Alter et al., 2011). A interação entre esses fatores pode resultar no desenvolvimento de diferentes quadros clínicos (Chapman & Hill, 2012). A hanseníase foi a primeira doença com caráter multigênico a ser descrita na literatura e representa um bom modelo de estudo de doenças infecciosas, já que a baixíssima variabilidade do *Mycobacterium leprae* fortalece a contribuição genética do hospedeiro para o desenvolvimento das formas clínicas (Alcais et al., 2009 & Moraes et al., 2006). Assim, a hanseníase exemplifica a complexidade das doenças infecciosas, em que o componente genético do hospedeiro tem papel fundamental para o desfecho da doença. Sabe-se que alterações sutis em determinados genes podem alterar a predisposição à infecção. Nesse sentido, diversos são os estudos que

avaliam o impacto dos polimorfismos genéticos no controle da infecção *per se* e na manifestação das formas clínicas da hanseníase (Sauer et al., 2015). O conjunto de resultados desses estudos pode levar ao melhor entendimento das bases moleculares que influenciam no desfecho da hanseníase e de outras doenças infecciosas (Prevedello & Mira, 2007).

1.1.2 - Histórico

A hanseníase é uma das doenças mais antigas do mundo. Sua origem é pré-histórica, visto que há evidências arqueológicas provenientes da África e Ásia, porém as teorias sobre a etiologia da hanseníase no mundo são controversas (Robbins et al., 2009). Os primeiros registros textuais sobre a doença apareceram nos papiros egípcios datados de 1550 a.c. (Hulse, 1972). Alguns estudos sugerem que a hanseníase teve sua origem na Ásia, a partir de evidências em esqueletos encontrados na Índia e Tailândia, e se espalhou para a África e Europa no século IV a.C (Molto et al., 2002; Tayles et al., 2004; Robbins et al., 2009). A hipótese mais bem aceita, baseada em genômica comparativa e análise filogenética, indica que a doença se originou no Oeste africano e foi propagada para outras regiões do mundo pelo fluxo de migrações contínuas durante a história da humanidade (Monot et al., 2009). Acredita-se que a doença foi introduzida no Brasil por europeus e Africanos durante o comércio de escravos no século XVIII (Monot et al., 2005) (Figura 1.1).

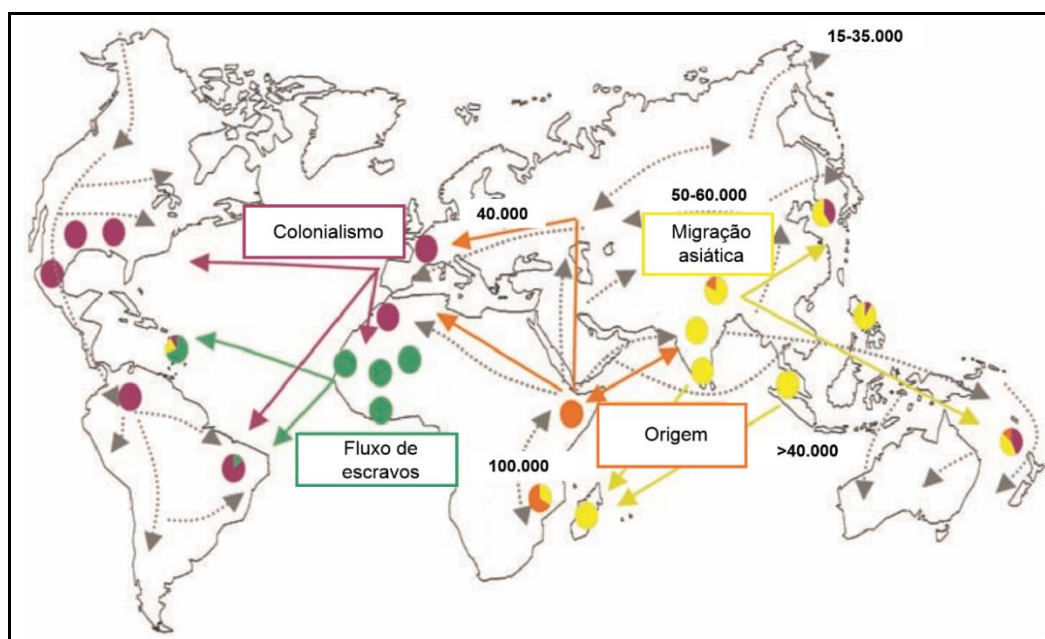


Figura 1.1 - Disseminação global da hanseníase demonstrada pelo padrão de frequência das diferentes cepas de *M. leprae*. O fluxo migratório da doença derivou da comparação de polimorfismos de base única

(SNPs) entre bactérias de diferentes regiões de cepas ancestrais. Os círculos indicam a região de origem e a proporção da contribuição dos SNPs analisados para as cepas da região. As setas coloridas indicam a direção do fluxo migratório da hanseníase que se correlacionam com as rotas de migração humana baseada em estudos antropológicos (Adaptado de Monot et al., 2005).

A palavra “lepra” foi originada para designar as deformidades da pele, que incluíam dermatoses como a psoríase, e o nome foi mantido durante a tradução do Novo e Velho Testamentos para o grego. Por muito tempo o termo “leproso” foi utilizado como estigma social, provocando preconceito e isolamento dos pacientes (Colin, 1981). Com isso, recentemente o Ministério da Saúde modificou o termo para “hanseníase” ou “doença de Hansen”, em homenagem a Gerhard Armauer Hansen, que em 1873 identificou o bacilo.

1.1.3 - Epidemiologia

Após a administração da PQT, a redução da prevalência (número de casos a cada 10.000 habitantes) mundial da hanseníase foi expressiva, passando de 1,00 em 1981 para valores inferiores a 0,52 em 2000. Porém, apesar dos esforços dos comitês de saúde para diminuir os índices da doença, observa-se ainda uma elevada prevalência da hanseníase em países onde a doença é endêmica. Na Figura 1.2 é possível observar a prevalência da hanseníase no mundo, referente ao ano de 2012, mostrando que o Sudão do Sul apresenta a maior prevalência, seguido do Brasil e Libéria, que contém cerca de 1 a 2 casos por 10.000 habitantes (OMS, 2013).

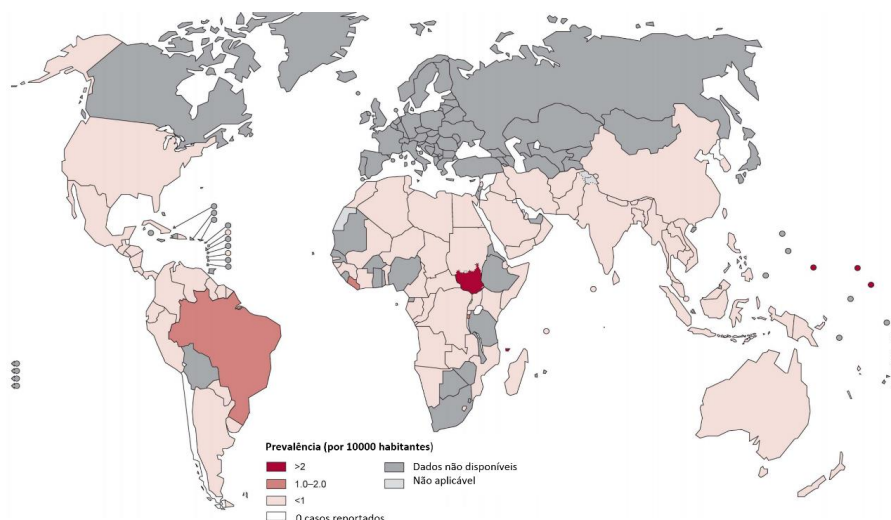


Figura 1.2 - Mapa da prevalência da hanseníase no mundo (OMS, 2013). A prevalência representa o número total de casos por 10.000 habitantes.

Em 2013, 215.656 novos casos de hanseníase foram reportados em todo o mundo, sendo que 13.289 dos pacientes apresentaram deformidades já instaladas. Isto reflete a gravidade da hanseníase nos países endêmicos, onde os sistemas de saúde são deficientes na detecção precoce da doença. Ainda, do total de novos casos, 9,2% ocorreram em crianças, o que mostra que a hanseníase apresenta uma transmissão contínua nesses países (OMS, 2013).

No Brasil, a hanseníase apresenta-se como grave problema de saúde pública (Penna et al., 2009). O país encontra-se em 2º lugar no ranking de detecção anual de novos casos, após a Índia (OMS, 2013). As áreas mais endêmicas concentravam-se na região Centro-Oeste, com algumas adjacências no Norte e Nordeste. Os municípios que concentram o maior número de casos são: Mato Grosso, Pará, Maranhão, Tocantins, Goiás, Rondônia e Bahia (SINAN, 2013) (Figura 1.3). Os estados do Sul, em contrapartida, encontram-se em uma fase de estabilização da endemia, apresentando coeficiente de detecção de 0,75 por 10.000 habitantes em 2002 (Magalhães, 2007). Entretanto, apesar da diminuição da endemia, os novos casos diagnosticados normalmente já apresentam grau de incapacidade 2. Os dados sugerem a necessidade de reforçar a atenção básica e a vigilância em saúde.

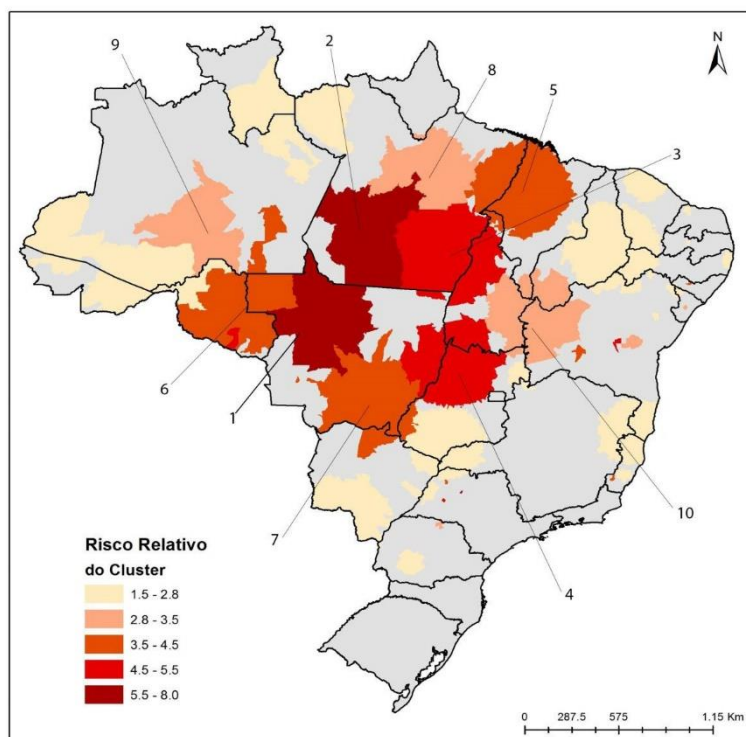


Figura 1.3 - Análise da taxa de detecção geral de hanseníase no Brasil no período de 2011-2013. Os números (1-10) representam os 10 clusters de maior risco relativo (SINAN, 2013).

A distribuição geográfica da doença ocorre preferencialmente em países de baixa condição socioeconômica, onde há deficiência no sistema de saneamento básico e

concentrações de aglomerados populacionais. Por conta desse quadro, a OMS instituiu a Estratégia Global Aprimorada para reduzir a hanseníase no mundo no período de 2011-2015. A meta defende a redução de 35% dos valores de novos casos com deformidade tipo 2 registrados em 2010 até o final de 2015. No Brasil, este programa de eliminação está entre as ações prioritárias do Ministério de Saúde. Além disso, programas de detecção em escolares a partir do autoexame são associados a campanhas que reúnem ações profiláticas para verminoses e tracoma. Entretanto, o monitoramento de casos para proteger indivíduos com maior risco de adoecimento, tais como contatos domiciliares que convivem com pacientes, não tem a cobertura desejada (OMS, 2013).

1.1.4 - Agente etiológico

O gênero *Mycobacterium* apresenta mais de 100 espécies de bactérias causadoras de doenças em animais e no homem, dentre as quais as mais conhecidas são o *Mycobacterium leprae* e a *Mycobacterium tuberculosis*.

A *Mycobacterium leprae* é uma bactéria gram positiva intracelular obrigatória. Infecta preferencialmente macrófagos da pele, onde apresentam-se em aglomerados, e é o único bacilo a infectar células de Schwann nos nervos periféricos (Nath, 2015). Sua descoberta, por Amauer Hansen em 1873, tem importância histórica por ter sido a primeira bactéria patogênica causadora de doença no homem identificada (Hansen, 1874).

O *M. leprae* apresenta-se sob a forma de um bacilo reto ou levemente encurvado com as bordas arredondadas. Contém uma estrutura capsular rica em lipídeos, sendo que um deles é o PGL-1, que apresenta um grupo fenólico glicolizado quimicamente distinto de outras bactérias (Hunter & Brennan, 1981). Por conta disso, a resposta humoral é altamente específica ao *M. leprae* durante a infecção (Spencer et al., 2011).

O *M. leprae* é um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) e a sua visualização é possível através da coloração de Ziel-Nielsen. É uma bactéria patogênica que tem desenvolvimento lento, em temperaturas abaixo de 37° C, e não cresce em meios de cultura axênicos *in vitro*, o que dificulta as investigações acerca da biologia durante a infecção. O modelo de infecção em camundongos constitui uma alternativa para o estudo da patogênese da hanseníase, permitindo o crescimento de bacilos viáveis para os estudos estruturais e bioquímicos (Nogueira et al., 1999). A bactéria é inoculada no coxim plantar de camundongos BALB/c ou de camundongos atímicos (nude), e, 6 a 9 meses depois, apresentam um maior número de bacilos viáveis para estudo (Shepard, 1962; Truman & Krahenbuhl, 2001). Outro

modelo de infecção utilizado para o estudo do *M. leprae* é o tatu (*Dasypus novemcinctus*) (Kirchheimer, 1975). Durante mais de mil anos acreditou-se que o homem era o único hospedeiro natural do *M. leprae* (Monot et al., 2009). Porém, em 1975, Kirchheimer detectou a ocorrência da doença em tatus de nove bandas no sul dos Estados Unidos (Truman, 2005). Assim, o modelo de infecção nestes tatus também tem sido proveitoso para o entendimento da patogênese da hanseníase, especificamente para o dano neural provocado pelo *M. leprae* (Sharma et al., 2013).

O genoma do *Mycobacterium leprae* é altamente conservado e apresenta um total de 3,31 Mb. Ao longo da evolução, essa espécie sofreu reduções no seu genoma, resultando na perda de genes importantes do metabolismo (Cole et al., 2001; Monot et al., 2009). O *M. leprae* contém o menor genoma do gênero *Mycobacterium* sequenciado até o momento. A evolução redutiva dessa bactéria foi responsável por eliminar mais de 2000 genes que provavelmente estariam envolvidos nas funções catabólicas, na cadeia oxidativa e respiratória, na produção de sideróforos e em vários circuitos regulatórios (Cole et al., 2001). A Tabela 1.1 compara as principais diferenças entre as espécies *M. tuberculosis* e *M. leprae*, demonstrando a extensiva redução de genes durante a evolução. Observa-se que o genoma do *M. tuberculosis* é maior e 90% dos seus genes codifica para proteínas funcionais, enquanto apenas 49,5% do genoma do *M. leprae* contém genes funcionais (Cole et al., 1998). Sugere-se que a perda de genes ocorreu devido a uma evolução adaptativa do bacilo, que alterou sua forma de vida livre para o parasitismo no nicho intracelular (Monot et al., 2009).

Tabela 1.1 - Comparação entre os genomas de *M. leprae* e *M. tuberculosis* (adaptado de Cole et al., 2001).

Característica	<i>M. leprae</i>	<i>M. tuberculosis</i>
Tamanho do genoma (pb)	3.268.203	4.411.532
G+C (pb)	57,8	65,6
Proteínas codificadas (%)	49,5	90,8
Genes codificantes (nº)	1.604	3.959
Pseudogenes (nº)	1.116	6
Densidade gênica (pb por gene)	2.037	1.114

Uma notável característica do *M. leprae* é a presença de muitos pseudogenes, que ocupam mais da metade do genoma (Singh & Cole, 2011) (Figura 1.4). Acredita-se que essa característica, associada a perda de genes, possa ser responsável pelo longo período de crescimento da bactéria (Cole et al., 2009). Apesar da evolução redutiva, a comparação entre diferentes cepas de *M. leprae* mostram que a variabilidade genética entre elas é baixa, ou seja,

as bactérias obtidas de regiões isoladas são praticamente indistinguíveis (Monot et al., 2005). Nesse sentido, a comparação de amostras obtidas de corpos bem preservados com 800-1000 anos de idade sugere que o *M. leprae* praticamente não sofreu mudanças genéticas, portanto o bacilo não alterou sua virulência ao longo dos anos (Schuenemann et al., 2013).

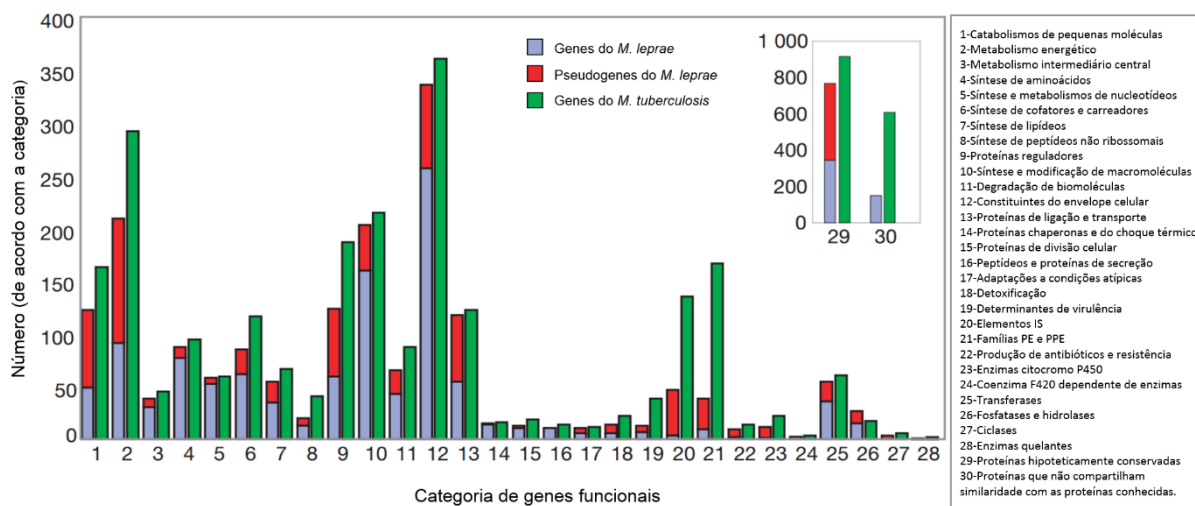


Figura 1.4 - Distribuição dos genes de *M. leprae* e *M. tuberculosis* de acordo com a categoria funcional. O número de genes totais (cinza) e de pseudogenes (vermelho) do *M. leprae*, assim como o número dos genes totais (verde) do *M. tuberculosis* são mostrados nas barras em vertical. As categorias funcionais representadas pelos números 1-28 foram definidas no quadro (Adaptado de Cole et al., 2001).

1.1.5 - Classificação da hanseníase

Diante da exposição ao *M. leprae*, a maioria dos indivíduos apresentam resistência frente a infecção ao bacilo, ou seja, dentre os que se infectam, apenas uma minoria progride para a doença ativa. Essa situação pode ser influenciada por múltiplos fatores como: a relação entre patógeno, meio ambiente e genes do hospedeiro. A intensidade da resposta imune desenvolvida frente ao bacilo reflete a progressão da doença para os diversos fenótipos (formas clínicas), que podem desenvolver-se até 30 anos após a infecção (Moraes et al., 2006). Acredita-se que, após a infecção, o indivíduo passa por um estágio de latência, no qual a doença pode permanecer assintomática por um longo período. Após esse estágio, a doença pode progredir para uma forma clínica inicial e transitória denominada intermediária (I) (Eichelmann et al., 2013). Aqueles que não são capazes de eliminar a micobactéria nesses estágios progridem para uma das formas clínicas estáveis da doença (Figura 1.5).

A etapa da classificação é de grande importância para o diagnóstico, pois é utilizada para determinar o tipo de tratamento apropriado. A classificação mais utilizada em pesquisa é a de Ridley e Jopling (1966), que propõe a existência de um espectro de formas clínicas segundo o estágio clínico e imunológico dos pacientes. A hanseníase é subdividida em 5 formas clínicas: tuberculóide (TT), *borderline* tuberculóide (BT), *boderline boderline* (BB), *borderline* lepromatosa (BL) e lepromatosa (LL). As formas TT e LL representam os pólos que exibem as formas localizada e disseminada da doença, respectivamente. Os pacientes LL apresentam numerosas lesões com grande chance de comprometimento neural. Nesse pólo a resposta imune humoral (Th2) é predominante, com perfil de citocinas ineficientes no controle do bacilo (IL-10 e IL-4) e, por isso, apresenta uma alta carga bacilar. Os indivíduos TT têm poucas lesões com bordas elevadas e bem delimitadas. Nesse pólo há maior atividade da imunidade celular (Th1), que induz a produção de citocinas tais como a IL-2 e IFN- γ , que vão ativar as respostas microbidas. Com isso, o macrófago consegue conter a disseminação dos bacilos, e por conta disso, a baciloscopia é baixa ou negativa. Entretanto, a resposta imune celular intensifica o dano tecidual observado na lesão. Entre estes polos estão as formas intermediárias, que apresentam imunidade instável variando de acordo com a proximidade a cada forma polar (Ridley & Jopling, 1966). Ainda, existe a forma neural pura (NP), que se caracteriza pela ausência de lesões na pele e espessamento de nervos. Normalmente, o diagnóstico deste quadro é mais dependente de técnicas laboratoriais como histopatologia ou PCR da biópsia de nervo (Jardim et al., 2005).

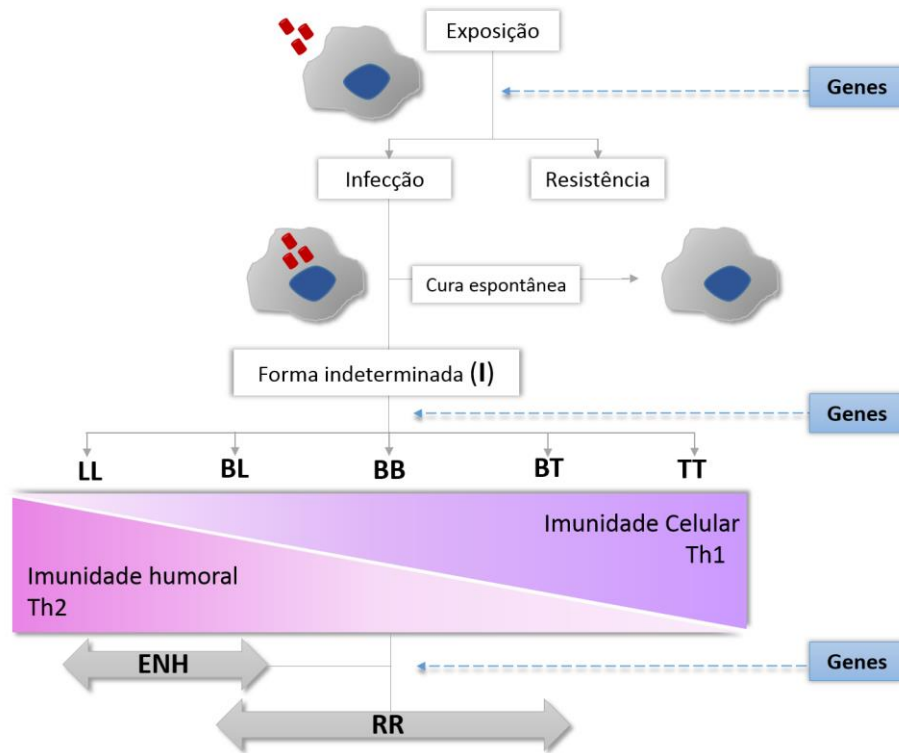


Figura 1.5 - Patogênese da hanseníase e classificação das formas clínicas. Após a exposição, indivíduos suscetíveis progridem para uma das formas clínicas que dependem do tipo de resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro. Os fatores genéticos influenciam os diferentes estágios desse modelo. LL – lepromatoso-lepromatoso; BL – *borderline*-lepromatosa; BB - *borderline-borderline*; BL – *borderline*-tuberculóide; TT – tuberculóide- tuberculóide. Os estágios reacionais compreendem o ENH (eritema nodoso hansênico) e a RR (reação reversa) (Adaptado de Mira, 2006 e Sauer, 2015).

Existe também a classificação operacional da OMS (1982) formulada para auxiliar no tratamento. Essa classificação é baseada no número de lesões e na carga bacilar, dividindo os pacientes em paucibacilares (PB) e multibacilares (MB). Pacientes paucibacilares apresentam baciloscopia negativa e os pacientes multibacilares apresentam índice baciloscópico positivo. Quando não é possível realizar a baciloscopia, os pacientes são classificados de forma prática segundo o número de lesões. Os pacientes paucibacilares apresentam não mais que 5 lesões de pele, enquanto os multibacilares contém 6 ou mais lesões.

Os episódios reacionais são processos inflamatórios intensos que acometem repentinamente os pacientes durante qualquer estágio da doença. Estes estágios de reações exacerbadas podem ocorrer ainda antes ou depois do início do tratamento e até pós-cura (Sauer et al., 2015). As perturbações imunológicas que levam aos episódios reacionais ainda

não são entendidas, no entanto, postula-se que as formas polares são mais estáveis, enquanto as formas intermediárias são mais propensas a desenvolver esses estágios (Nath, 2015).

A reação tipo 1, ou reação reversa (RR), é um quadro de inflamação aguda na pele e em nervos que ocorre principalmente em pacientes das formas *borderline*. Nesse episódio, há aumento das citocinas IL-2, IFN- γ e TNF e diminuição das citocinas IL-4, IL-5 e IL-10, evidenciando que a RR parece estar associada ao súbito aumento da imunidade celular direcionada a antígenos de *M. leprae* (Yamamura et al., 1991).

A reação tipo 2, ou eritema nodoso hansênico (ENH), é um episódio crônico que ocorre com mais frequência em pacientes lepromatosos e *borderline*-lepromatosos. Manifesta-se por lesões eritematosas e nódulos inflamados acompanhados de sintomas sistêmicos como febre, prostração e dor. As reações tipo 1 e 2 ocorrem separadamente, mas podem progredir no mesmo paciente em momentos distintos (Kahawita et al., 2008). Acredita-se que os estágios reacionais compartilham os mesmos mecanismos de controle molecular, já que o perfil de citocinas liberados em ambos os episódios é semelhante (Moraes et al., 1999; Scollard et al., 2006).

1.1.6 - Transmissão

Admite-se que a transmissão do *Mycobacterium leprae* se dá pela inalação do bacilo devido ao contato contínuo com pacientes multibacilares sem tratamento. O material genético do bacilo já foi identificado na mucosa nasal e swab bucal de pacientes e contatos domiciliares (Patrocínio et al., 2005). Portanto, a hipótese mais bem aceita é a de que a mucosa nasal é a via principal de entrada e saída da micobactéria e a mucosa oral seria o segundo sítio envolvido na transmissão. Vale a pena ressaltar que pacientes paucibacilares eventualmente podem apresentar uma carga bacilar alta o suficiente para viabilizar a transmissão (Martinez et al., 2010).

O ambiente intradomiciliar é o principal foco de transmissão e uma atenção especial para os familiares que vivem conjuntamente com os pacientes (contatos domiciliares) deve ser dada. Sabe-se que contatos de pacientes multibacilares apresentam cinco vezes mais chances de adoecer quando comparados com a população geral (Fine et al., 1997). Assim, é possível especular que quanto mais intenso o contato, maior a exposição. No entanto, foi visto que a transmissão entre cônjuges é menor do que entre outros membros da família. Isso pode ser explicado devido às diferenças genéticas individuais, considerando-se que, ao contrário dos

cônjuges, entes familiares compartilham as mesmas características genéticas do caso índice (paciente da família) (Joyce et al., 2012).

Por outro lado, a existência de poucos pacientes multibacilares em determinadas áreas sugere outras fontes de infecção (Guinto, 1941). Nesse sentido, têm-se discutido a provável disseminação da hanseníase como uma zoonose através da transmissão pelo tatu, pois já foi evidenciada a existência de bacilos nesses animais selvagens (Truman et al., 2005). O estudo do grupo do Dr. Richard Truman com a cooperação do Dr. Stewart Cole demonstrou que o *M. leprae* isolado de casos de hanseníase autóctone nos EUA apresentavam o mesmo genótipo de cepas isoladas de tatu (Truman et al., 2011). Outro estudo epidemiológico evidenciou que pacientes que não têm histórico de casos de hanseníase na família mantinham o hábito de consumo da carne de tatu (Deps et al., 2003). A confirmação dessa via de transmissão envolve outras estratégias de controle, dificultando ainda mais a erradicação da hanseníase.

1.1.7 – Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico de hanseníase é basicamente clínico, realizado através da verificação de sinais periféricos como manchas e lesões na pele, espessamento de nervos e perda de sensibilidade e força muscular. O exame clínico é acompanhado do questionamento do histórico familiar do indivíduo, visando verificar o contato prévio com pacientes.

Exames complementares como a baciloscopia e a histopatologia ajudam no diagnóstico e são realizados em centros com estrutura laboratorial. A baciloscopia é feita para identificar bacilos no esfregaço de linfa cutânea, que é coletada dos lóbulos das orelhas, cotovelos e joelhos. Esse método permite a avaliação qualitativa e quantitativa dos bacilos após a coloração pelo método Ziehl-Neelsen (Cocito et al., 1985). Porém, algumas formas clínicas podem apresentar baciloscopia negativa, e requerem a utilização de outros métodos para o diagnóstico. O exame histopatológico é realizado pelas colorações de hematoxilina-eosina e Fite-Faraco, que evidencia bacilos álcool-ácido-resistentes (Lastória et al., 2014). A histopatologia evidencia a morfologia do tecido de biópsias de pele e nervos sensitivos de pacientes, permitindo a identificação de infiltrado mononuclear, epitélio granulomatoso e fibrose, características essenciais das lesões hansênicas (Antunes et al., 2012).

Testes sorológicos também são utilizados para auxiliar no diagnóstico clínico. Nesse exame, investiga-se a presença de antígenos como o glicolípido fenólico-1 (PGL-1), específico de *M. leprae*, encontrado em abundância na parede celular do bacilo. Utiliza-se

ainda ensaios imunoenzimáticos, como o ELISA, para a busca de anticorpos anti-PGL-1 nesses pacientes. Mais recentemente, testes baseados na detecção de uma proteína de fusão denominada LID-1, desenvolvida pelo Instituto de Pesquisa de Doenças Infeciosas (IDRI) de Seattle, também têm sido utilizados (Souza et al., 2014). Estes testes mostram uma relação direta entre os títulos de anticorpos e a carga bacilar. Detecta-se menos anticorpos (quando detectável) em pacientes paucibacilares em relação aos multibacilares (Moura et al., 2008). Nesse caso, a detecção sorológica poderia ser utilizada como teste complementar à baciloscopia para a classificação clínica (Drüppe et al., 2012). Sendo assim, nos últimos 10 anos estudos vêm avaliando a detecção sorológica direta em soro ou sangue em sistemas de testes rápidos a partir de imunocromatografia em papel (Moura et al., 2014).

A técnica mais sensível desenvolvida para o diagnóstico de hanseníase é a quantificação do DNA de *M. leprae* por reação em cadeia da polimerase (PCR) (Santos et al., 1997). Essa técnica também é específica, pois amplifica regiões únicas do genoma do bacilo mesmo que esse se encontre em pequenas quantidades no tecido do paciente. Mais recentemente, tem-se utilizado a técnica de PCR em Tempo Real como ferramenta para a rápida detecção e quantificação da carga bacilar de diferentes regiões do genoma do *M. leprae*, tais como o RNAr 16S, *sodA*, o elemento repetitivo RLEP e o complexo de antígenos 85B (Martinez et al., 2011). Além disso, essa técnica permite a amplificação do genoma do bacilo em amostras de linfa, sangue, secreção nasal e biópsias, auxiliando em casos de difícil diagnóstico com histopatologia inconclusiva (Martinez et al., 2006; Martinez et al., 2014). No entanto, independentemente da existência de métodos sorológicos e moleculares, não há aplicação dessas metodologias na rotina da atenção básica, o que torna difícil o diagnóstico e a classificação clínica. Com isso, o diagnóstico tardio tem sido um dos grandes obstáculos ao controle da hanseníase, pois inviabiliza o tratamento anterior ao acometimento neural e prejudica o bloqueio da transmissão. O tratamento do paciente após o diagnóstico é essencial para interromper o fluxo do bacilo no ambiente domiciliar.

A PQT, instituída pelo Ministério da Saúde segundo os critérios da OMS, é administrada conforme a classificação operacional dos pacientes, como mostrado na Tabela 1.1. O coquetel baseia-se na associação oral e supervisionada de rifampicina, dapsona e clofazimina (apenas em pacientes multibacilares) para se evitar resistência bacteriana ao medicamento. O tratamento é gratuito, e para garantir que ele ocorra corretamente, evitando a recidiva, é necessária supervisão dos centros de saúde.

Tabela 1.2 - Esquema padrão de tratamento da hanseníase (OMS, 1982).

Classificação do paciente	PQT	Duração
Paucibacilar	Rifampicina (600mg mensal)	6 meses
	Dapsona (100mg diária)	
Multibacilar	Rifampicina (600mg mensal)	12 meses
	Dapsona (100mg diária)	
	Clofazimina (300mg mensal e 50mg diária)	

1.1.8 - Estratégias de estudo genético em hanseníase

A heterogeneidade de formas clínicas e a variabilidade na suscetibilidade *per se* a doenças infecciosas levou os pesquisadores a concluir, ao longo dos anos, que o componente genético do hospedeiro tem importância central no desenvolvimento das doenças infecciosas (Alcaïs et al., 2007). No caso da hanseníase, a hipótese da existência de um componente hereditário vem sendo investigada desde a Idade Média (Prevedello et al., 2007). A influência genética na predisposição à hanseníase foi confirmada, inicialmente, em estudos observacionais em gêmeos, análise de agregação familiar (pedigrees) e segregação complexa. Estes estudos comprovaram a herança genética na resposta à infecção, porém não evidenciam os *loci* genéticos envolvidos. Assim, o passo seguinte foi a compreensão da natureza molecular da região genômica relacionada a predisposição, e para isso foram utilizados estudos de ligação e associação (Abel et al., 1988; Feitosa et al., 1995).

Os estudos de ligação e de associação genética são os dois maiores grupos de estudos que permitem testar a contribuição dos genes na susceptibilidade a doenças infecciosas. O estudo de ligação consiste em identificar regiões cromossômicas ligadas ao fenótipo, as quais abrigam diversos genes que podem ser responsáveis pelo desfecho. Este estudo é resultado de um mapeamento fino cujo objetivo é localizar genes relacionados ao desfecho em um intervalo cromossômico mais estreito possível (Prevedello et al., 2007). O *locus* candidato a ser estudado pode estar em regiões adjacentes à genes anteriormente associados ao desfecho. Geralmente, utiliza-se amostras de famílias para avaliar a co-segregação dos marcadores com o fenótipo de interesse. O estudo de ligação não tem o poder de resolução na identificação de um único gene associado ao desfecho. Normalmente, esse estudo identifica regiões grandes e resulta em genes candidatos para estudos de associação genética (Dawn & Barret, 2005).

O estudo de associação analisa as frequências do marcador genético em um grupo de indivíduos afetados e não afetados com o desfecho, determinando de forma mais precisa o marcador responsável pelo efeito. Nestes estudos são utilizados genes candidatos identificados em estudos em larga escala ou que tenham mostrado uma implicação biológica consistente com o desfecho (Pacheco & Moraes, 2009). Os estudos de associação utilizam modelos populacionais, frequentemente em desenhos de estudo caso-controle ou grupos de famílias (Newport et al., 2011). O estudo de associação tem a vantagem de que o recrutamento populacional não apresenta tantas dificuldades como o recrutamento de famílias, além de apresentar um poder estatístico aumentado devido a possibilidade de incluir um maior número de indivíduos estudados (Risch, 2000). Esse fato torna os estudos de associação caso-controle os mais bem utilizados em genética epidemiológica.

Os marcadores genéticos frequentemente avaliados em estudos de associação são os polimorfismos de base única (SNPs), sequências repetitivas em tandem (VNTRs), microssatélites (STRs) e variação no Número de Cópias (CNV). Devido à dificuldade encontrada na genotipagem de marcadores multialélicos (STRs e VNTRs), utiliza-se majoritariamente os SNPs como marcadores em estudos de associação genética (Pacheco & Moraes, 2009). Alguns SNPs, denominados "tag SNPs", são mais informativos pois representam blocos de marcadores em desequilíbrio de ligação (LD), permitindo inferir sobre a presença e associação dos demais, auxiliando no mapeamento de marcadores na região (Stram et al., 2004).

Estes marcadores são testados em populações de casos e controles, sendo que estes últimos correspondem aos indivíduos sadios representativos da população de onde vieram os pacientes. Isso denota que os controles devem ser coletados da mesma área geográfica dos pacientes, onde todos os indivíduos sofreram a mesma exposição ambiental ao desfecho. Esse ponto é uma desvantagem para esse tipo de estudo, pois há certa dificuldade de recrutamento de indivíduos que de fato representam a mesma população de origem dos pacientes (Cardon & Bell, 2001). Sendo assim, a seleção bem definida do fenótipo a ser chamado de caso e o agrupamento adequado de controles são processos cuidadosos para o desenho de estudo. Além disso, ainda há a desvantagem da estratificação populacional, que pode enviesar o resultado final de associação. A estratificação ocorre quando a casos e controles apresentam frequências alélicas distintas em virtude de características intrínsecas de cada população e não do desfecho de interesse. Isso ocorre porque nem sempre indivíduos de ambos os grupos compartilham os mesmos hábitos sócio-demográficos. Portanto, algumas variáveis que

poderiam confundir o resultado devem ser corrigidas durante a análise, evitando erros bruscos na relação entre exposição e desfecho (Pacheco & Moraes, 2009).

Nesse âmbito, uma alternativa ao estudo caso-controle populacional é o uso de amostras de famílias. O desenho de famílias é composto por trios, na qual se têm os pais biológicos e o filho afetado, onde avalia-se o padrão de transmissão do alelo marcador de pais heterozigotos para o filho doente (Strachan & Read, 2002). Nesse caso, verifica-se se o padrão de transmissão do alelo difere do esperado utilizando os testes de desequilíbrio de transmissão (TDT). O estudo em famílias elimina o viés de estratificação populacional devido ao controle genético interno, uma vez que os alelos não transmitidos pelos pais são utilizados como controle daqueles que foram transmitidos. Contudo, esse desenho também apresenta limitações, pois o número de famílias exigidas para um poder estatístico robusto é elevado. Além disso há dificuldade em recrutar famílias informativas já que os genótipos dos indivíduos são inferidos depois do recrutamento das mesmas (Cardon & Palmer, 2003).

Mais recentemente, os estudos pangenômicos de associação ou GWAS (do inglês, *Genome wide association study*) têm permitido a identificação de genes supostamente não relacionados ao desfecho de interesse (Marquet & Schurr, 2001). O GWAS permite avaliar milhares de polimorfismos genéticos presentes ao longo do genoma e identificar marcadores associados ao desfecho de interesse independentemente de hipóteses *a priori*. Estes estudos vêm ganhando força nos últimos anos, devido à identificação de importantes genes associados a doenças complexas, além de apresentarem maior poder de associação devido ao grande número populacional (Pearson & Manolio, 2008). Contudo, embora estes estudos sejam poderosos, acabam gerando uma quantidade imensa de resultados, tornando difícil a completa análise e interpretação dos dados (Prevedello & Mira, 2007).

A associação genética do marcador com o desfecho pode ainda ser corroborada através de estudos de replicação realizados em outras populações, assim como a utilização de estratégias como a meta-análise na tentativa de estabelecer uma estimativa de associação que reflita um consenso entre a literatura. Além disso, abordagens funcionais, como expressão gênica e dosagem do perfil de citocinas ou proteínas são etapas importantes para tentar desvendar o papel biológico do marcador associado ao desfecho. A Figura 1.6 ilustra as principais estratégias utilizadas para o estudo de doenças infecciosas. Dentre as abordagens, a minuciosa escolha do estudo é de vital importância para o mapeamento e confirmação de genes associados à doença (Moraes et al., 2006).

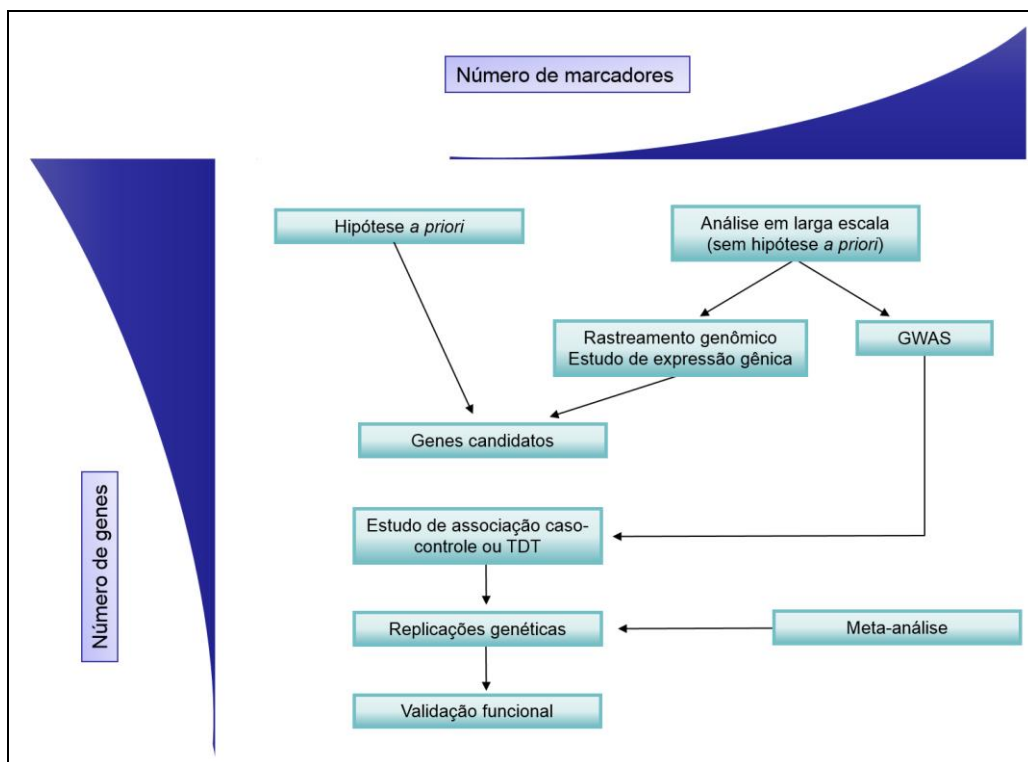


Figura 1.6 - Estratégias de estudo genético em doenças infecciosas. Os genes candidatos são escolhidos com base em hipótese *a priori* ou a partir de estudos em larga escala. O GWAS faz um rastreamento de SNPs ao longo do genoma e resulta em genes candidatos a serem testados em estudos de associação. Estes são realizados a partir de desenhos populacionais (caso-controle) ou em famílias. As etapas de replicação, meta-análise e validação funcional são essenciais para confirmar as associações encontradas. (Adaptado de Cardoso et al., 2011).

1.1.9 - Genes associados à hanseníase

1.1.9.1 - Resposta imune inata

A resposta imune inata regula a entrada dos patógenos na célula via receptores e moléculas de sinalização. Os receptores de complemento, receptor de manose, receptores do tipo toll e tipo NOD são cruciais para o reconhecimento e entrada da bactéria na célula e para a ativação de macrófagos. Dada a participação chave desses receptores na resposta imune inata mediante a infecção pelo *M. leprae*, a identificação de SNPs que possam modificar a expressão ou ativação desses receptores é de grande interesse para se entender a predisposição à doença.

O primeiro estudo de rastreamento genômico em hanseníase foi conduzido em famílias Indianas e detectou a ligação de um *locus* de suscetibilidade na região 10p13 (Siddiqui et al., 2001). O mapeamento fino da região evidenciou a associação do gene *MRC1*, que codifica o receptor de manose (MR), relacionado com a internalização do *M. leprae*. O mapeamento foi realizado com base em um estudo de associação caso-controle e em famílias recrutados no Vietnã e no Brasil. Como resultado, variações do gene de *MRC1* foram associadas ao desenvolvimento da hanseníase em pacientes multibacilares Brasileiros e Vietnamitas (Alter et al., 2010). Porém, essa região também foi associada em pacientes paucibacilares Indianos, e até então, nenhuma definição sobre a participação desse gene havia sido concluída (Siddiqui et al., 2001). Recentemente, o grupo do Dr. Erwin Schurr verificou a associação dos genes de *CUBN* e *NEBL* (ligado à região 10p13) ao desenvolvimento de hanseníase multibacilar nas famílias Vietnamitas. A partir de então, sugere-se que a região 10p13 abriga variantes genéticas que têm impacto sobre a polarização da hanseníase (Grant et al., 2014).

Diversos trabalhos já demonstraram a associação dos receptores tipo Toll (TLR1, TLR2 e TLR4) com a hanseníase (Suryadevara et al., 2012; Suryadevara et al., 2013; Bochud et al., 2009). Os receptores TLRs são proteínas transmembrana envolvidas no reconhecimento de padrões (PRR) de componentes de microorganismos (Basu et al., 2012). A desregulação das vias de TLR está associada a desordens inflamatórias e a suscetibilidade a doenças infecciosas (Gay & Gangloff, 2007; Krutzik & Modlin, 2004). Os receptores TLR1/TLR2, presentes em monócitos/macrófagos, reconhecem lipoproteínas das micobactérias e ativam essas células, normalmente induzindo a produção de vitamina D e peptídeos microbicidas (Krutzik et al., 2003; Shin et al., 2010). Já os receptores TLR1/TLR6 estão relacionados a persistência do *M. leprae* nas células de Schwann (Mattos et al., 2011).

O *TLR1* foi o primeiro gene da família de receptores tipo Toll a ser associado à hanseníase *per se*. Wong e colaboradores demonstraram que o polimorfismo +1805T>G (I602S), presente na região codificante do *TLR1*, estava associado a proteção (alelo G) na população indiana em estudos em larga escala e em duas replicações independentes (Wong et al., 2010). A associação verificada nestes estudos indica a relevância do *TLR1* na suscetibilidade à hanseníase *per se*. No entanto, a avaliação funcional é complexa, já que, ao contrário do esperado, o alelo G está relacionado com a menor ativação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF em células estimuladas com o *M. leprae* (Misch et al., 2008). Nesse contexto, Hart e colaboradores sugerem que a resistência provocada pela variante 602S

ocorre devido à inibição da produção e circulação de produtos micobacterianos utilizados para a subversão da resposta imune (Hart & Tapping, 2012).

Outro polimorfismo do *TLRI* muito estudado é o SNP N248S. Schuring e colaboradores demonstraram que o genótipo SS está associado a suscetibilidade a hanseníase na população de Bangladesh (Schuring et al., 2009). Recentemente, um trabalho do nosso grupo revelou que a variante 248S está associada a suscetibilidade a hanseníase na população Brasileira a partir de estudos caso-controle e TDT conduzidos em populações de diferentes regiões do país. A presença dessa variante provoca diminuição da razão TNF/IL-10 em células polimorfonucleares estimuladas com *M. leprae*, o que corrobora o achado genético. A meta-análise deste estudo com o de Bangladesh confirmou a associação de risco da variante 248S com a hanseníase (de Sales Marques et al., 2013).

Outro receptor relacionado é o da vitamina D, codificado pelo gene *VDR*, que regula a transcrição de fatores da resposta imune contra patógenos e exerce uma variedade de efeitos sobre as células. Alterações genéticas no *VDR*, especificamente uma mutação silenciosa no códon 352 (T>C), foi associada a suscetibilidade a hanseníase tuberculóide e lepromatosa na população indiana (Roy et al., 1999). Em outro trabalho, indivíduos homozigotos “tt” da população de Malawi apresentaram chance aumentada (OR = 4,3) de desenvolver a doença (Fitness et al., 2004). Recentemente, Neela e colaboradores mostraram a associação de polimorfismos do *VDR* nos sítios FokI (rs2228570-ff) e ApaI (rs7975232-AA e Aa) e dos haplótipos T-f-a e T-F-A com o risco a hanseníase em Indianos (Neela et al., 2015). Entretanto, o papel das variações genéticas no receptor de vitamina D ainda é ambíguo e estudos mais aprofundados são necessários.

Mesmo assim, o papel da via de vitamina D na ativação de resposta imune protetora é confirmado por uma série de ensaios imunológicos. Neste contexto, foi vista aumento da expressão do miRNA-21 em lesões de pacientes LL comparado a pacientes TT. Esse aumento está relacionado a inibição da ativação de importantes genes da via microbicida dependente de vitamina D, demonstrando que esse é um mecanismo utilizado pelo bacilo para evadir a resposta antimicobacteriana (Liu et al., 2012). Outro microRNA, o miR-146, identificado como diferencialmente expresso em biópsias de pele de pacientes MB e PB, foi alvo de uma análise genética do nosso grupo. Os dados deste estudo sugerem uma associação do alelo C do SNP miR-146 (rs2910164 G>C) com a suscetibilidade à hanseníase, sendo que os carreadores de C apresentam um maior nível de produção de miR-146 maduro. Esse microRNA tem a capacidade de modular a resposta imune, observado pela diminuição dos

níveis de TNF na presença do alelo C, consistente com a associação na direção de suscetibilidade encontrada (César-de-Melo et al., 2014).

O primeiro estudo pan-genômico em hanseníase foi realizado na população chinesa e identificou uma série de genes *TNFSF15*, *NOD2*, *RIPK2*, *CCDC122*, *LACC1* e *HLA-DR-DQ* associados a hanseníase (Zhang et al., 2009). Os três primeiros genes fazem parte da via de sinalização do receptor NOD2. Neste estudo, os SNPs rs9302752 e rs7194886 do gene *NOD2* foram associados com a suscetibilidade a hanseníase. A replicação em Indianos não identificou associação, ao passo que em Vietnamitas a associação de risco foi vista para um outro SNP (rs8057341) (Wong et al., 2010; Grant et al., 2012). Outros estudos também verificaram a associação de outras variantes de *NOD2* com a hanseníase, indicando que há uma via que regula a sinalização através do *NOD2* e que estaria associada com susceptibilidade à hanseníase (Berrington et al., 2010; Schenk et al., 2012). Com isso, o nosso grupo publicou uma replicação independente em um estudo caso-controle e em famílias Brasileiras. Esse estudo confirmou a associação de risco do *NOD2* (rs8057431) e *CCDC122-LACC1* (rs4942254) com a hanseníase, sugerindo fortemente que a via de *NOD2* está associada com susceptibilidade à hanseníase (Sales-Marques et al., 2014). Para melhor compreensão, são necessários estudos que permitam esclarecer a relação genótipo-fenótipo, de modo a caracterizar o papel de cada polimorfismo na regulação da suscetibilidade a doença.

O primeiro estudo de rastreamento genômico com marcadores do tipo VNTR em larga escala em hanseníase ocorreu na população Vietnamita, que identificou um pico de ligação na região do cromossomo 6q25-q27, relacionada com a suscetibilidade a hanseníase *per se* (Mira et al., 2003a). Este mesmo grupo realizou uma análise de clonagem posicional subsequente, caracterizando a região 6q25, que identificou que o efeito estava relacionado aos genes *PARK2* e *PACRG*, genes que não participavam das vias clássicas associadas a hanseníase até então (Mira et al., 2004). Sabe-se que o gene *PARK2* participa das vias de defesa contra patógenos invasores, pois codifica uma E3 ubiquitina ligase, que direciona as bactérias intracelulares para a via de autofagia (Manzanillo et al., 2013).

Em sequência, foi feita a replicação do estudo na população Brasileira, que confirmou a associação dos SNPs *PARK2* -2599 e rs1040079 da região promotora de *PARK2/PACRG* com a suscetibilidade à hanseníase (Mira et al., 2004). Em 2013, Alter e colaboradores realizaram um mapeamento de alta densidade e um estudo de desequilíbrio de ligação (LD) na região de *PARK2/PACRG* nas populações Vietnamita e Indiana. Esse estudo identificou dois SNPs (rs1333955 e rs2023004) que capturam a associação nessas populações (Alter et al.,

2013). Com isso, esses trabalhos demonstram a forte participação dos genes de parkina no desenvolvimento da hanseníase (Schurr et al., 2007), porém, uma conclusão ainda é complicada, pois os SNPs estudados não são os mesmos nas diferentes populações e a estrutura genômica de LD em Vietnamitas e Indianos é complexa. Ainda no gene *PARK2*, um outro estudo verificou que há uma interação entre SNPs na região promotora (rs9365492 e rs9355403) e SNPs presentes em genes de citocinas pró-inflamatórias/anti-inflamatórias podem estar associados à predisposição à hanseníase na população Indiana (Chopra et al., 2014). Por fim, a associação de suscetibilidade do SNP -2599 do *PARK2* com a hanseníase também foi vista no modelo de infecção da febre tifoide e paratifoide na Indonésia, porém com valores de OR (razão de risco) menores (Ali et al., 2006). Esse achado mostra que, genes que regulam a imunologia de doenças micobacterianas podem estar associados com outros patógenos intracelulares. Isso significa que algumas doenças, aparentemente não relacionadas, compartilham os mesmos fatores de risco.

1.1.9.2 - Resposta imune adaptativa

O locus do complexo HLA, localizado em região altamente polimórfica no cromossomo 6 (6p21), foi uma das primeiras regiões a serem estudadas em relação à predisposição a hanseníase. Diversos estudos de ligação e associação reportaram o envolvimento dos alelos do HLA na suscetibilidade à hanseníase (Vries et al., 1980). A região do HLA tem importante papel no processamento e ligação de peptídeos antigênicos durante a resposta imune. A alternância entre os perfis de resposta tipo Th1 e Th2 devido às diferenças no processamento de antígenos e nas interações célula-célula é o que torna essa região ligada a predisposição à hanseníase (Mira et al., 2006). Um estudo em famílias Vietnamitas evidenciou uma forte ligação da região *TNF/HLA* com a hanseníase, mostrando que gêmeos dizigóticos que manifestaram diferentes formas clínicas de hanseníase apresentaram também diferentes haplótipos (Mira et al., 2003b). O estudo pan-genômico em chineses confirmou dezenas de SNPs associados à hanseníase na região de *HLA/TNF* em (Zhang et al., 2009). Um dos estudos mais consistentes da associação entre o complexo HLA e a hanseníase foi realizado por nosso grupo com amostras da população do Rio de Janeiro, onde observou-se a associação dos alelos de *HLADR*015* e *HLADR*04* com o risco e a resistência à hanseníase, respectivamente (Vanderborgh et al., 2007).

O *TNF* também está localizado na região 6p21 e está envolvido com a modulação da resposta imune e a atividade pró-inflamatória. Esse gene de citocina tem sido muito estudado

em doenças infecciosas devido ao seu papel na atividade inflamatória. O principal polimorfismo estudado é o SNP -308G>A, localizado na região promotora do *TNF*. Esse SNP foi estudado em diferentes populações, que indicaram resultados discrepantes em relação à direção de associação (Roy et al., 1997, Santos et al., 2000; Sapkota et al., 2010). A fim de definir um consenso entre tais estudos, nosso grupo realizou um estudo de meta-análise incluindo não apenas os dados da literatura, mas também dados novos de estudos caso-controle e TDT em populações Brasileiras. Este estudo confirmou que o alelo -308A no gene de *TNF* participa da suscetibilidade a hanseníase na população Brasileira. É interessante ressaltar que a população Brasileira e indiana apresentam associação inversa dos alelos de *TNF*, ou seja, o alelo -308A está associado a proteção à hanseníase em Brasileiros (com a confirmação em diversas populações de regiões distintas) enquanto que em Indianos o mesmo alelo está associado ao risco da doença (Roy et al., 1997; Cardoso et al., 2011). Esse achado é curioso e sugere que a análise de haplótipos estendidos devem ser considerada.

O gene *LTA*, que codifica a linfotoxina- α , também faz parte da superfamília de *TNF*. Esse gene controla a infecção por patógenos intracelulares como o *M. tuberculosis* através da regulação da sinalização celular (Roach et al., 2001). Alcais e colaboradores identificaram a existência de um SNP de linfotoxina- α (*LTA*+80A>C) associado com a susceptibilidade a hanseníase em jovens (<25 anos) Vietnamitas e Indianos. Já em Brasileiros, a associação manteve a mesma direção, porém no limite de significância (Alcais et al., 2007). Além disso, já foi visto que os genes *TNF* e *LTA* atuam de maneira conjunta na manutenção da resposta granulomatosa ao *M. leprae*. O primeiro gene tem papel na formação, e o segundo na integridade do granuloma (Hagge et al., 2009).

Em relação ao gene *IFNG*, que codifica o IFN- γ , a troca +874T>A representa o polimorfismo mais estudado. Foi visto que o alelo T deste SNP foi relacionado ao aumento da produção de IFN- γ , promovendo resistência à tuberculose (Sallakci et al., 2007). Esse SNP também foi associado a proteção à hanseníase em estudo caso-controle na população Brasileira, na qual foi observado maiores níveis de IFN- γ em células de indivíduos carreadores do alelo protetor (Cardoso et al., 2010). Recentemente, Silva e colaboradores realizaram uma meta-análise recrutando os dados da literatura e adicionando o estudo em outras populações, confirmando os dados já reportados (Silva et al., 2014).

Adicionalmente, SNPs na região promotora do gene *IL10* também estão associados a suscetibilidade à hanseníase. A IL-10 é uma citocina liberada por macrófagos e leucócitos e tem papel supressor da resposta inflamatória, capaz de modular os níveis de TNF- α e IL-1 β (Moraes et al., 2006). Altos níveis de IL-10 têm sido observados em pacientes multibacilares

comparados aos paucibacilares (Kuhn et al., 1993). Um SNP muito estudado nesse gene é o *IL10* -819 C>T, localizado na região promotora. A associação de suscetibilidade a hanseníase foi encontrada entre os carreadores do alelo T na população Brasileira (Santos et al., 2002). Este achado foi corroborado pelo estudo de haplótipos que resultou na associação de proteção do haplótipo -3575A/-2849G/-2763C, enquanto o haplótipo -3575T/-2849A/-2763C foi associado a suscetibilidade a hanseníase (Moraes et al., 2004). Posteriormente, a replicação na população Indiana também confirmou a associação de suscetibilidade a hanseníase (Malhotra et al., 2005).

1.2 – Importância do ferro na infecção por patógenos intracelulares

1.2.1 - Homeostase do ferro no organismo humano

O ferro é o quarto elemento mais abundante do ambiente terrestre e está disponível na forma de íon férrico nas células. Funciona como cofator vital para importantes proteínas relacionadas ao transporte de oxigênio, produção de DNA e aminoácidos, detoxificação e respiração celular (Donovan et al., 2005). Além disso, o ferro participa da constituição do grupamento heme de hemoglobinas e em mioglobinas nos músculos. As fontes principais de ferro para o organismo são a dieta e a reciclagem de hemácias senescentes (Grotto et al., 2008).

Cerca de 1 a 2 mg de ferro inorgânico ou ferro heme são absorvidos pelo epitélio intestinal após a digestão. O ferro heme é proveniente da quebra de hemoglobinas e mioglobinas, enquanto o ferro inorgânico é adquirido através da alimentação. O metabolismo de ferro envolve a proteína transportadora de metal divalente (DMT-1) e a ferroportina (FPT). A DMT-1, ou NRAMP2, é um transportador de diversos metais e necessita que o ferro tenha sido reduzido de Fe^{+3} para Fe^{+2} pela enzima redutase citocromo b duodenal (Dcytb). Outro carreador, a proteína transportadora do heme-1 (HCP1), internaliza o ferro heme que é liberado pela heme oxigenase no interior da célula. O ferro livre é armazenado na forma de ferritina ou exportado pela transferrina, que se liga ao íon oxidado (Fe^{+3}). O receptor de transferrina (Trf) é um forte regulador dos níveis de ferro na célula, sinalizando para a sua maior ou menor absorção (Grotto et al., 2008). O esquema de metabolismo do ferro nas células humanas é mostrado na Figura 1.7.

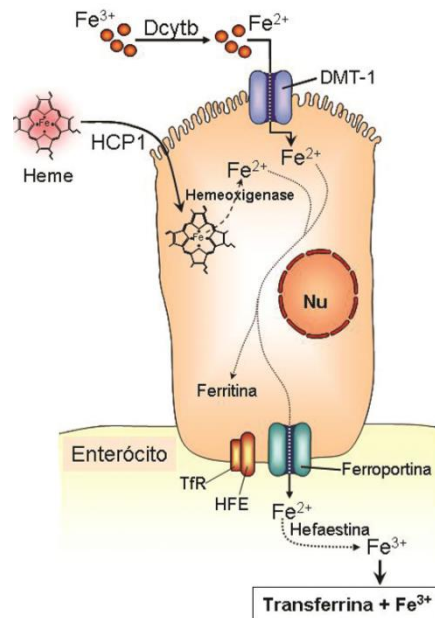


Figura 1.7 - Metabolismo do ferro no organismo humano. O enterócito e sua relação com as proteínas envolvidas com a absorção do ferro. Havendo maior demanda de Ferro, aumenta-se a expressão de Ferroportina e DMT-1, que carrega Fe^{2+} . A HCP1 internaliza o Ferro heme proveniente da dieta. O Fe^{2+} é liberado pela hemoxigenase e fará parte da ferritina ou será transportado para o sangue pela transferrina, que tem afinidade pelo Fe^{3+} . A proteína da hemocromatose (HFE) também participa da regulação do Ferro através da interação com o Tfr. Dcytb: ferredoxina; DMT-1: transportador de metal divalente-1; HCP-1: proteína transportadora do heme-1; Nu: núcleo; HFE: proteína da hemocromatose; TfR: receptor da transferrina (Adaptado de Grotto et al., 2008).

Os macrófagos representam um importante reciclador de ferro através da fagocitose de hemácias senescentes. A degradação do heme envolve o catabolismo por diferentes enzimas que liberam como subprodutos o monóxido de carbono (CO), ferro e bilirrubina, sendo que os restos da hemoglobina são reaproveitados para a formação de novos aminoácidos. Um importante regulador da degradação e armazenamento de ferro nos macrófagos é a hepcidina, hormônio que faz a comunicação entre os locais de absorção, utilização e estoque de ferro. A hepcidina tem atividade antimicrobiana pois tem a capacidade de romper as membranas microbianas, além de estar relacionado à depleção de ferro em macrófagos (Park et al., 2001). As ferroportinas funcionam como receptor de hepcidina. Esse hormônio inibe o tráfego de ferro pelas ferroportinas, bloqueando a saída de ferro da célula em macrófagos e enterócitos (Figura 1.8) (Delaby et al., 2005). A regulação da hepcidina se dá pelas demandas de ferro e estado inflamatório, sendo que a sobrecarga de ferro aumenta a sua expressão, enquanto a anemia e a hipóxia reduzem-na. A IL-6 também já regula positivamente os níveis desse hormônio (Nemeth et al., 2004).

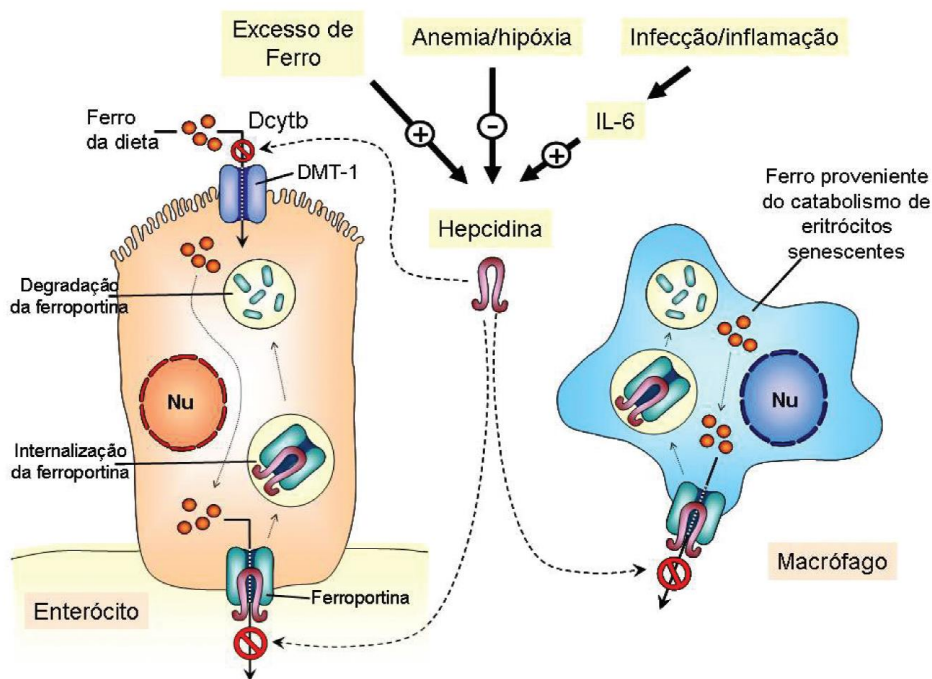


Figura 1.8 – Ação da hepcidina na regulação do ferro em enterócitos e macrófagos. O complexo hepcidina-ferroportina formado é internalizado nos domínios da membrana basolateral de macrófagos e a ferroportina é degradada, bloqueando a liberação do ferro dessas células. No macrófago, o ferro fica acumulado no seu interior, diminuindo o ferro disponível para a eritropoiese (figura à direita). No enterócito, o ferro não é transportado para o exterior da célula, e a absorção é inibida (figura à esquerda) (Adaptado de Grotto et al., 2008).

O equilíbrio entre absorção, utilização e estoque é essencial para a manutenção da concentração de ferro no organismo. A deficiência de ferro provoca um estado de hipoferremia, manifestado por diferentes graus de anemia. Em contrapartida, o excesso do ferro pode ser deletério às células, pois o ferro livre catalisa a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), o que provoca estresse oxidativo e perturba a estrutura celular. Portanto, diversos organismos desenvolveram técnicas para regulação de ferro e manutenção das concentrações ideais para sobrevivência (Dussurget, 1998).

1.2.2 – Captação de ferro frente a infecção por patógenos intracelulares

A sobrevivência e virulência bacteriana durante o processo de infecção dependem da sua capacidade de competir com o hospedeiro por elementos chaves ao crescimento, como o ferro. Esse nutriente é essencial para a disseminação bacteriana, funcionando como cofator

para diferentes enzimas do metabolismo celular (Dussurget, 1998). Em micobactérias, o ferro é cofator para hemoproteínas do metabolismo do oxigênio e é utilizado por citocromos envolvidos no transporte de elétrons (de Voss et al., 1999). Acredita-se que, para um crescimento ótimo, as micobactérias necessitam de cerca de 7 - 48 µg de ferro por grama de massa celular. Estudos *in vitro* mostram que concentrações de ferro abaixo dos valores de referência restringem o crescimento micobacteriano (McCready et al., 1978). Devido a tal importância, as micobactérias tiveram que desenvolver mecanismos de obter, armazenar e regular o uso do ferro para a sua propagação.

Um importante mecanismo de defesa das células humanas contra bactérias patogênicas é limitar o acesso ao ferro para esses microorganismos circulantes. Nesse sentido, o quadro de anemia durante as infecções por micobactérias, independente da causa, constitui uma estratégia para diminuição de ferro livre (Baynes et al., 1986). Além da anemia, as proteínas transferrina e lactoferrina também evitam a livre circulação desse elemento, pois funcionam como importantes quelantes de ferro para armazenamento e transporte do íon (Weindenbergl et al., 1999). A maioria das bactérias consegue acessar os quelantes de ferro no meio extracelular, entretanto, patógenos intracelulares foram obrigados a desenvolver a capacidade de trazer o ferro para o ambiente intracelular (Finkelstein et al., 1983).

Sendo assim, apesar dos esforços citados anteriormente, os microorganismos patogênicos têm a capacidade de burlar a célula hospedeira e modular a maquinaria molecular a favor do seu crescimento. As bactérias intracelulares se tornaram especialistas na captação de ferro por diferentes estratégias, como: a produção de um redutor solúvel que reduz o íon férrico para íon ferroso, síntese de receptores para transferrina e lactoferrina, indução de hemólise e liberação de toxinas, reaproveitamento do heme livre e produção de sideróforos (Dussurget et al., 1998). Os sideróforos são pequenos peptídeos produzidos por algumas espécies de *Mycobacterium* que funcionam como quelantes de ferro solúvel. Apresentam uma alta afinidade pelo íon férrico e são secretadas para competir com outras moléculas ligantes de ferro quando a concentração desse íon está limitada na célula. Assim, a síntese dos sideróforos é controlada pela abundância de ferro no meio extracelular (Voss et al., 1999).

1.2.3 - Metabolismo de ferro por micobactérias

A importância do ferro para o desfecho de doenças micobacterianas é vista em diversos estudos. Sabe-se que pacientes tuberculosos tratados com dieta rica em ferro apresentam aumento da multiplicação do bacilo, acompanhada de uma diminuição do efeito

bacteriostático da célula. Nesse contexto, a suplementação de ferro em indivíduos portadores de *Mycobacterium tuberculosis* aumenta a chance de progressão para tuberculose ativa e de morte por tuberculose (Murray et al., 1978 & Moyo et al., 1997). Além disso, o complexo do *Mycobacterium avium*, responsável por infecções possivelmente letais em pacientes HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) positivos, também depende de ferro para sua proliferação. Foi visto que macrófagos de indivíduos soropositivos são ricos em Ferro, o que pode explicar a predisposição à infecção por micobactérias desse complexo (Douvas et al., 1993). Assim, a disponibilidade de Ferro no organismo e os esforços da bactéria para contornar a restrição desse elemento são fatores críticos para o resultado da infecção por micobactérias.

Um dos mecanismos mais especializados de captação de Ferro por algumas micobactérias são os sideróforos, moléculas altamente especializadas na captação de Ferro, detalhadas posteriormente. O primeiro gene envolvido na captação de Ferro em micobactérias foi o *fxbA*, que codifica uma formiltransferase necessária para a síntese de exoquelina (um tipo de sideróforo) em *Mycobacterium smegmatis* (Fiss et al., 1994). Juntamente com esse gene, proteínas repressoras, como o *ideR* e *Fur*, são reguladores da expressão de sideróforos e das respostas ao estresse oxidativo (Dussurget et al., 1996).

O gênero *Mycobacterium* desenvolve-se no interior de fagossomos, vacúolos que se localizam no interior de macrófagos e são pobres em Ferro. Para contornar essa situação, algumas micobactérias, como o *M. tuberculosis*, são altamente especializadas em sequestrar ferro das células de mamíferos, mesmo em condições em que esse íon não é abundante. Essas espécies produzem dois sideróforos principais (micobactinas e exoquelinas) que sequestram o íon férrico e o internalizam através dos receptores de regulação de ferro IrtAB (De Voss et al., 2000; Rodriguez et al., 2006). A micobactina está associada à membrana da bactéria e transporta ferro para o citoplasma. Existem ainda as carboximicobactinas, quelantes solúveis que carregam ferro através do transportador IrtAB ou roubam ferro da transferrina para o fagossomo (Gobin et al., 1996). Além disso, o *M. tuberculosis* também adquire ferro através do heme (Tullius et al., 2011) e das proteínas transferrinas e lactoferrinas humanas (Olayanmi et al., 2004; Boradia et al., 2014). No entanto, estudos *in vitro* mostram que a cepa nocaute para micobactina é capaz de manter a viabilidade micobacteriana, o que ressalta a independência da transferrina na sobrevivência da bactéria e sugere a possível existência de mecanismos alternativos de captação de ferro (Lambrecht et al., 1993). A Figura 1.9 mostra os possíveis mecanismos de captação de Ferro no modelo de *M. tuberculosis*, descritos até o momento.

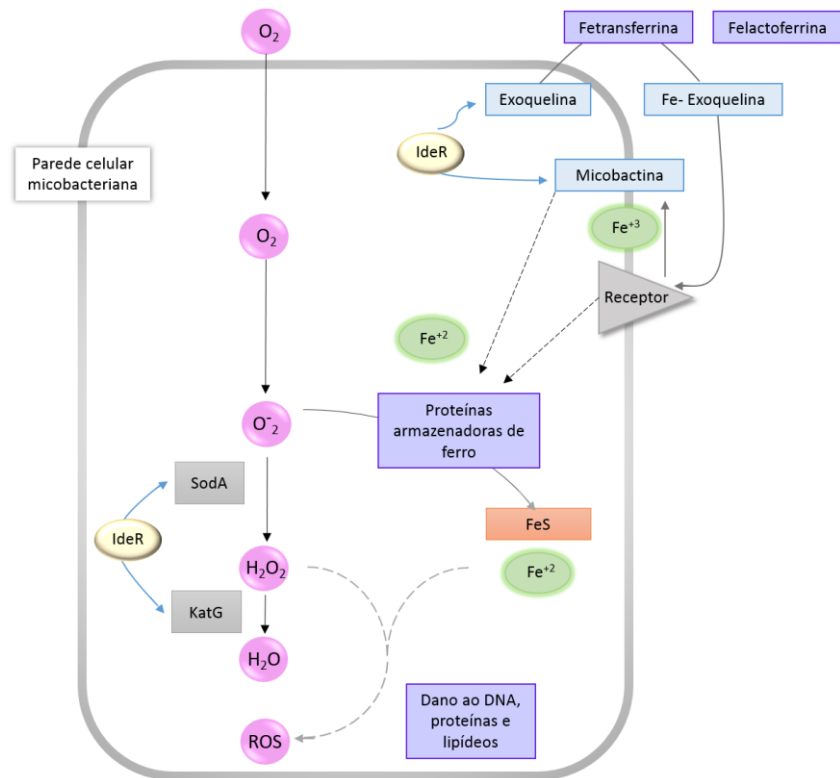


Figura 1.9 - Modelo de captação de ferro por micobactérias. A bactéria secreta exoquelina solúvel, que se liga a transferrina ou lactoferrina e, por uma via dependente de energia transfere o ferro para a micobactina via receptores de membrana. A micobactina armazena Fe^{+3} e a liberação dos sideróforos envolve a redução para Fe^{+2} . No citoplasma, o ferro é incorporado por moléculas heme ou sulfato ferroso (FeS). Superóxidos, produzidos pela redução de moléculas de O_2 , podem inativar FeS e liberar o Fe^{+2} . Superóxidos e peróxidos de hidrogênio são altamente reativos, e para evitar dano celular, a bactéria produz enzimas específicas contra as espécies reativas de oxigênio (ROS). O superóxido dismutase (SodA) reage com o O_2^- e a peroxidase (KatG) combate o poder oxidante da H_2O_2 . O gene IdeR tem papel central nessa rede, tanto regulando a biossíntese de sideróforos como as enzimas antioxidantes. (Adaptado de Dussurget & Smith, 1998).

1.2.4 - Modulação de ferro pelo *Mycobacterium leprae*

O *Mycobacterium leprae* não apresenta o sistema especializado de sideróforos. Acredita-se que essa espécie perdeu os genes responsáveis pela produção desses quelantes ao longo da evolução reductiva, e, portanto, esse patógeno provavelmente desenvolveu outros mecanismos de sequestro de ferro (Cole et al., 2001). Sabe-se que o *M. leprae* tem proteínas

alternativas reguladoras de ferro, o que explica a sua sobrevivência no ambiente hostil do hospedeiro (Wheeler et al., 1990). Pessolani e colaboradores demonstraram a existência de um tipo de bacterioferritina (Brf) utilizado pelo *M. leprae*, a proteína de membrana MMP II, relacionado a homeostase de ferro nessa espécie (Pessolani et al., 1994). Contudo, ainda não existem trabalhos que mostrem o mecanismo exato pelo qual o *M. leprae* adquire ferro para sua sobrevivência.

Até o momento, estudos têm sugerido a contribuição de moléculas envolvidas na regulação das hemoglobinas para a formação de um ambiente rico em ferro para o *M. leprae*. Moura e colaboradores mostraram que macrófagos de pacientes lepromatosos apresentam uma maior expressão do receptor CD163 associado ao aumento dos estoques de ferro e viabilidade do *M. leprae* (Moura et al., 2012). O receptor CD163 pertence à família dos receptores *scavengers* e está relacionado ao ciclo de renovação das hemácias. Esses receptores são expressos em resposta a liberação de IL-10 em macrófagos residentes e monócitos infiltrantes de tecidos em reações inflamatórias (Sulahian et al., 2000). Assim, sugere-se que o aumento de CD163 em macrófagos LL, além de induzir um fenótipo anti-inflamatório, pode indicar uma via de suplementação de ferro para o *M. leprae*, já que a depuração de hemoglobinas envolve a liberação de heme. Assim, visto que o CD163 parece apresentar um papel na acumulação de ferro em macrófagos de indivíduos hansênicos e, ao mesmo tempo está atrelado à depuração de hemácias, faz-se necessário estudar o processo de metabolização das hemoglobinas.

As hemoglobinas são um complexo protéico que armazenam a maior parte do ferro existente no organismo e estão contidas nas hemácias circulantes. O ciclo de renovação de hemácias envolve a liberação de hemoglobina e reaproveitamento do ferro contido no heme. O grupamento heme, por sua vez, é extremamente reativo, e a sua exposição devido a oxidação de hemoglobinas livres provoca estresse oxidativo (Thom et al., 2013). Nesse contexto, os macrófagos têm papel central na depuração da hemoglobina, evitando o estresse oxidativo que é um processo tóxico para a célula.

Após os eventos de hemólise provocados durante o curso da malária, por exemplo, a enzima haptoglobina se liga com alta afinidade à hemoglobina livre, formando o complexo Hp-Hb. Esse complexo Hb-Hp é internalizado por macrófagos via receptores CD163 (Mendonça et al., 2012). Eventualmente, a Hb livre no citoplasma pode também se ligar diretamente ao receptor CD163 (Shaer, 2006). No interior de macrófagos, a enzima heme-oxigenase-1 é a responsável por degradar o heme livre, liberando os subprodutos monóxido

de carbono, bilirrubina e ferro, sendo que o ferro poderia ser utilizado por microorganismos intracelulares (Shaer, 2005).

Ainda não está claro qual o papel do ferro no processo de infecção por bactérias no ambiente do hospedeiro, todavia sabe-se que a captação e o metabolismo desse íon é indispensável para o processo de infecção. É provável que genes e vias ainda desconhecidos também regulem a disponibilidade de ferro no ambiente intracelular durante a infecção e auxiliem na captação por parte da micobactéria. Além disso, os macrófagos são as células que mais armazenam ferro no organismo humano, porém, o processo pelo qual esse metal é trafegado até o fagossomo também é desconhecido (Finch et al., 1982). Como será visto neste trabalho, existe uma associação entre o gene *PKLR*, a instabilidade de hemácias e ocorrência de anemias, e, conseqüentemente, níveis intracelulares de ferro. Essa relação será apresentada adiante e explorada na nossa hipótese.

1.3 - O *PKLR*

1.3.1 - Piruvato Kinase

O gene *PKLR* (PYRIvate Kinase Liver and Red Blood Cells) codifica a enzima piruvato quinase (PK). A PK é a enzima chave da via glicolítica, responsável por catalisar a transfosforilação do fosfoenolpiruvato em piruvato e ATP. A enzima atua na última etapa da via glicolítica e promove uma reação irreversível e indispensável para o fornecimento de energia para a célula (Figura 1.10). Além disso, tem papel central no metabolismo de bactérias, plantas e vertebrados, uma vez que o seu produto piruvato está envolvido em muitas vias metabólicas. A PK, junto com a fosfofrutoquinase (PFK), são consideradas as enzimas reguladoras da glicólise (Zanella et al., 2007).

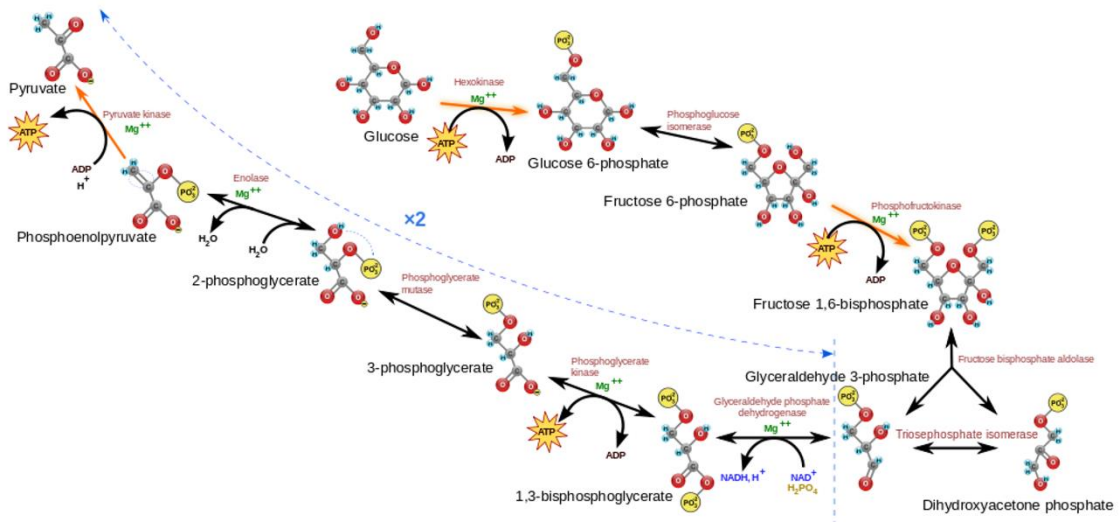


Figura 1.10 - Via glicolítica. A PK atua ao final da cadeia convertendo fosfoenolpiruvato em piruvato e ATP. Essa enzima necessita de K^+ , Mg^{2+} ou Mn^{2+} para sua atividade. As setas laranjas indicam reações irreversíveis e as setas pretas reações reversíveis. (Fonte: <http://biomedicinaemacao-unip.blogspot.com.br/2012/04/via-glicolitica-ou-glicolise.html>).

Em mamíferos, existem 4 isoenzimas PK sítio-específicas. A enzima tipo L é encontrada no fígado, córtex renal e no intestino delgado, enquanto a enzima tipo R é exclusiva dos eritrócitos. O *PKM2*, localizado na região cromossômica 15q22, é o gene que codifica as isoenzimas presentes majoritariamente nos músculos (tipo M1 e tipo M2) (Zanella et al., 2005). A isoenzima M1 é encontrada no músculo esquelético, coração e cérebro, e a isoenzima M2 localiza-se nos leucócitos, rins, tecido adiposo e pulmões. Essas enzimas também são encontradas no fígado e rins (Tsutsumi et al., 1988).

O gene *PKLR* contém cerca de 9,5 Kb e está organizado em 12 éxons e 11 introns que se localizam no cromossomo 1, região q21 (Sato et al., 1988). Acredita-se que o primeiro e o segundo éxons do gene *PKLR* contenham dois promotores tecido-específicos que transcrevem para a enzima tipo R e tipo L, respectivamente, durante a diferenciação dos eritrócitos e hepatócitos (Lacronique et al., 1992). As isoformas PKR, PKL e PKM1 e M2 são produto de *splicing* alternativo, gerando enzimas específicas para os tecidos (Noguchi et al., 1986; Tani et al., 1988).

As enzimas PK apresentam diferentes propriedades cinéticas que refletem a particularidade metabólica exigida para cada tecido. As quatro isoformas consistem em subunidades iguais de 60 kDa, mas diferem nas propriedades enzimáticas e na regulação da expressão gênica. Os tipos R e L apresentam a região carboxi-terminal idênticas, porém o tipo R possui uma cadeia de peptídeos cerca de 3500 Da maior que o tipo L, provavelmente

localizada na região amino-terminal. Sugere-se que essa cadeia confere maior estabilidade a isoforma R em eritrócitos, já que essas células não possuem maquinaria para a síntese de proteínas (Noguchi et al., 1987).

Contudo, independentemente do tecido no qual a enzima irá ser produzida, a função final da PK é a produção de ATP para a sobrevivência celular. Essa enzima tem papel crucial em eritrócitos, que são células anucleadas e desprovidas de mitocôndrias, dependentes da glicólise para o fornecimento de energia. Sendo assim, a PK é crucial para o metabolismo energético dos eritrócitos, responsável pelo seu funcionamento e a integridade das células vermelhas (Jacobash et al., 1996).

Nesse contexto, mutações no gene *PKLR* que resultam na deficiência da piruvato quinase provocam uma depleção de ATP nos eritrócitos, que, por sua vez, diminui a meia vida dessas células. Sabe-se que existem diferentes mutações associadas a esse efeito e que, inclusive, são a causa principal da anemia hemolítica. Nessa condição, a glicólise se torna ainda mais diminuída devido à inibição da hexoquinase pelo aumento de 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG). Esse metabólito pode estar três vezes aumentado na célula e, nessa condição, prejudica o fluxo da glicólise. A consequência direta é a diminuição do *turnover* de hemácias, contribuindo para reduzir ainda mais os níveis de ATP nestas células (Zanella et al., 2000 & Jacobash et al., 1996).

1.3.2 - Mutações no *PKLR*

A deficiência da piruvato quinase é a anormalidade enzimática mais frequente da via glicolítica e é a principal causa da anemia hemolítica hereditária não esferocítica (Valentine et al., 1961). Essa deficiência é provocada por mutações no gene *PKLR* que geram uma enzima com características anormais (Oski et al., 1963). Até o momento, 220 mutações e 8 sítios polimórficos relacionados a anemia hemolítica não esferocítica foram descritas no gene *PKLR*. A maioria das mutações identificadas são de troca de códon (69%), envolvendo sequências de aminoácidos altamente conservadas, mutações de alterações de sítios de *splicing* (11%) e mutações em códon de parada (5%) (Muñoz et al., 2003). Cabe ressaltar que as mutações mais frequentes em pacientes com deficiência da PK estão distribuídas de acordo com um forte componente étnico e regional (Zanella et al., 2005).

As mutações que levam a anormalidades na PK podem ocorrer em enzimas tipo L e tipo R, porém os efeitos clínicos ocorrem somente nos eritrócitos, uma vez que no fígado a deficiência é compensada pela manutenção da produção da enzima pelos hepatócitos

(Nakashima et al., 1977). Assim, as manifestações clínicas dessa deficiência compreendem a hemólise crônica e diferentes graus de anemia, que variam de leve e compensada a anemias graves que exigem transfusões sanguíneas recorrentes (Zanella et al., 2000).

Em indivíduos com deficiência na PK, o quadro de anemia é provocado pela redução da sobrevivência dos eritrócitos e pela eritropoiese irregular devido ao desequilíbrio nos níveis de ATP (Min-Oo et al., 2005). Com isso, estes indivíduos podem desenvolver um aumento de ferro. Muitas vezes esse aumento pode ocorrer devido às repetidas transfusões, porém, os pacientes que não recebem transfusão também apresentam o quadro de aumento de ferro (Zanella et al., 1993). Com isso, nós sugerimos que além de diminuir os níveis de ATP, as mutações no *PKLR* também estão associadas a uma sobrecarga de ferro nos pacientes. Isso de fato ocorre, pois a lise de hemácias provoca o aumento do *turnover* de ferro, quadro esse que é agravado pela eritropoiese irregular (Zanella et al., 2001).

1.3.3 - Polimorfismos no *PKLR* e predisposição a doenças infecciosas

Na literatura, a deficiência da PK tem sido fortemente associada com a resistência a malária. Os primeiros estudos que evidenciaram essa relação foram feitos em modelos de camundongo e culturas *in vitro*. Min-Oo e colaboradores observaram que camundongos que carregam um locus associado à suscetibilidade a malária apresentaram resistência ao parasita devido a uma mutação de perda de função no gene *PKLR* (Min-oO et al., 2003). Em seguida, Ayi e colaboradores infectaram eritrócitos de indivíduos com deficiência de PK com o *Plasmodium falciparum*, observando que esses indivíduos foram capazes de conter o parasita (Ayi et al., 2008). Ainda, o mesmo grupo observou que pacientes que são resistentes ao *Plasmodium* apresentam depleção de ATP nos eritrócitos (Ayi et al., 2009).

Por outro lado, um estudo do grupo do Dr. Phillippe Gros registrou a associação da deficiência da piruvato quinase com a suscetibilidade a um patógeno intracelular (*Salmonella typhimurium*). Roy e colaboradores identificaram um locus (Ity4) que confere suscetibilidade a infecção por *Salmonella typhimurium* em camundongos. O locus de suscetibilidade Ity4 mostrou pico de ligação à região do *PKLR*. Neste estudo, os camundongos que carregam o locus Ity4 foram infectados com *Plasmodium chaubaudi*, apresentando resistência à infecção. Portanto, através de estudos funcionais e comparativos entre espécies, esse grupo identificou que o *PKLR* também confere suscetibilidade à *S. typhimurium* (Roy et al., 2007).

A partir de 2010, os primeiros estudos genéticos em humanos com o *PKLR* foram desenvolvidos. Nesse ano, Alves e colaboradores identificaram um forte desequilíbrio de

ligação entre regiões distantes e adjacentes do *PKLR* em indivíduos Africanos de Cabo Verde (Alves et al., 2010). Em seguida, Machado e colaboradores avaliaram um conjunto de SNPs e STRs em regiões adjacentes e no *locus* do *PKLR* em Africanos com malária, comparando com portugueses PK-deficientes e sadios. As frequências alélicas desses SNPs apresentaram-se diferenciadas nas populações Africanas e Portuguesas, e uma região de forte desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos foi verificada (Machado et al., 2010).

Ainda em um estudo subsequente, a enzima PK fisiológica foi avaliada em pacientes com malária de Moçambique, Angola, Guiné Equatorial Guiné e São Tomé e Príncipe. Foi identificado que 4% desses indivíduos apresentavam baixa atividade da enzima. Além disso, mutações não sinônimas apresentaram uma frequência aumentada nestes indivíduos (Machado et al., 2012). Em conjunto, esses estudos sugerem que a região do *PKLR* é conservada e está sofrendo uma forte pressão seletiva em Africanos a favor da proteção contra o patógeno da malária.

A partir dessas evidências, a hipótese deste trabalho baseia-se na ideia de que mutações que promovam deficiência da PK, que previamente foi associado à anemia hemolítica, poderiam estar conferindo resistência à malária e suscetibilidade a patógenos intracelulares devido a alterações sutis nos níveis de ferro. Já é bem descrito que o gene *PKLR* vem sofrendo pressão seletiva pelo patógeno da malária, sendo assim, sugerimos que as frequências diferenciadas dos polimorfismos nas populações Africanas e Brasileira poderia estar sugerindo um padrão de pegadas evolutivas no gene *PKLR*. Nesse sentido, o presente estudo trabalha a hipótese sobre o modelo de doenças infecciosas micobacterianas por *Mycobacterium leprae* e *Mycobacterium tuberculosis*.

1.4 – Tuberculose

A tuberculose (TB) é uma doença micobacteriana provocada pelo *Mycobacterium tuberculosis*. Assim como na hanseníase, o desenvolvimento da doença depende do *background* genético do hospedeiro associados a fatores ambientais. A tuberculose se desenvolve em cerca de 5 a 10% dos indivíduos que são expostos ao bacilo. O cenário epidemiológico mundial da TB é considerado grave e apresentou uma piora expressiva nos últimos anos devido ao surgimento de cepas multi-droga resistentes (MDR) e ao acometimento de pacientes infectados com o HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana). Somente no ano de 2013, 9 milhões de casos de TB foram diagnosticados em todo o mundo, sendo que 1,1 milhão de pacientes eram também soropositivos e 480 mil foram infectados com cepas MDR (OMS, 2014).

Acredita-se que os mecanismos de exposição, infecção e progressão do estado de latência a doença ativa são processos semelhantes entre as duas micobactérias. O *M. tuberculosis* apresenta maior virulência, e conseqüentemente, acomete maior número de casos. Entretanto, considerando o pequeno número de marcadores de infecção existentes (PPD e IGRA), o estudo da doença é limitado à avaliação do processo de contágio à doença. A resposta imuno-inflamatória protetora ao *M. tuberculosis* é iniciada pela fagocitose do bacilo em macrófagos alveolares, que iniciam a liberação de mediadores bactericidas tais como óxido nítrico, radicais intermediários de nitrogênio e produtos da via de ativação da vitamina D, como a catalecidina (Fabri et al., 2011). Estas células induzem a liberação das citocinas inflamatórias TNF, IL-6, IL-12 e IL1 β , que por sua vez, ativam linfócitos que secretam IFN γ e LTA entre outras citocinas que regulam a formação do granuloma e a multiplicação micobacteriana (Kappor et al., 2013). A influência genética no desfecho da tuberculose, bem como em hanseníase, já foi constatada em diversos estudos. Curiosamente, a variabilidade genética do *M. tuberculosis*, que apresenta cepas com virulência distintas, dificulta a análise aprofundada do papel dos genes do hospedeiro na suscetibilidade a infecção. Portanto, em comparação com a hanseníase, há um número menor de genes que estão associados a TB em relação ao número de estudos realizados. Alguns dos estudos caso-controle têm sido acompanhados de meta-análises, resultando na sugestão do papel modesto, mas consistente, de variações genéticas em genes que regulam a resposta imune contra micobactérias. Dentre eles estão os genes *IFNG*, *IL10* e *VDR*, entre outros que já foram associados à suscetibilidade/resistência à TB (Silva et al., 2014; Ke et al., 2015; Cao et al.,

2015). Curiosamente, os estudos pan-genômicos (GWAS) não foram capazes de identificar claramente regiões/genes associados a TB (Thye et al., 2010).

As respostas antimicrobianas estimuladas pela presença de micobactérias, assim como de outra classe de patógenos intracelulares, desencadeiam a ativação de respostas efetoras que se sobrepõem, dado que muitas das vias de entrada do patógeno e de reconhecimento de padrões são os mesmos. Nesse contexto, é provável que patógenos que apresentem a mesma interação patógeno-hospedeiro estejam envolvidos com as mesmas respostas imunológicas. Assim, variações em genes que regulam as vias de resposta imune podem estar relacionadas com a suscetibilidade a diferentes doenças causadas por patógenos intracelulares. Nesse sentido, o estudo de diferentes doenças infecciosas que compartilham o mesmo *background* relacionado à infecção, assim como a comparação com os resultados descritos na literatura, pode auxiliar na elucidação das bases moleculares que influenciam os fenótipos clínicos das doenças infecciosas.

Um trabalho recente de colaboração com o nosso laboratório identificou a associação do gene *PKLR* (alelos rs11264355C e rs11264359A) com a proteção à tuberculose na população de Moçambique (Mabunda, 2013). Esse resultado ajudou na compreensão da associação dos mesmos marcadores do *PKLR* (rs11264355G e rs11264359G) com a suscetibilidade à hanseníase na população Brasileira (Lima-Bezerra, 2013). Até o momento, estes foram os únicos trabalhos que verificaram a associação do *PKLR* em doenças micobacterianas. Esse achado preliminar fortalece a ideia de que polimorfismos no gene *PKLR* que protegem contra a malária poderiam estar também associados à suscetibilidade a patógenos intracelulares. Contudo, é necessário o estudo aprofundado de mais marcadores na região do *PKLR* para compreender quais variantes são, de fato, as principais no controle da predisposição a essas ou outras doenças infecciosas.

2. JUSTIFICATIVA

A hanseníase tem sido utilizada como modelo clássico de estudo de suscetibilidade genética a infecções por patógenos intracelulares. Esse fato justifica-se por ser uma doença provocada por um patógeno de sobrevivência intracelular obrigatória, o *Mycobacterium leprae*, que pouco sofreu modificações no genoma ao longo da evolução. Devido a sua baixa patogenicidade, o contato com o bacilo não é suficiente para provocar a doença. Além disso, a hanseníase apresenta uma variedade de formas clínicas que progridem dependendo da resposta imune desenvolvida, portanto sugere-se que os genes do hospedeiro são cruciais para o desenvolvimento da doença. Nesse contexto, estudos vem tentando desvendar os principais marcadores genéticos responsáveis por regular a resistência *versus* susceptibilidade a micobactérias e outros patógenos intracelulares.

Além dos genes já descritos, é provável que genes envolvidos em vias ainda não associadas a hanseníase também participem na susceptibilidade a doença (Moraes et al., 2006). Estudos prévios de nossa equipe identificaram novos genes e novas vias envolvidas com a patogênese da hanseníase. Dentre as vias principais identificadas, destacam-se as vias de IFN tipo-I e de metabolismo basal da glicólise e cadeia respiratória. Portanto, o desdobramento inicial deste projeto consistiu na confirmação genética dos estudos funcionais através da análise de genes dessas vias.

O gene *PKLR*, que codifica a enzima piruvato kinase, tem participação fundamental no desenvolvimento da malária (MIN-Oo et al., 2004). Sabe-se que a região cromossômica do gene *PKLR* está sofrendo elevada pressão seletiva e estudos têm encontrado diferenciação nas frequências genotípicas entre as populações africanas e europeias (Alves et al., 2009). Mutações no *PKLR* que conferem deficiência da enzima PK estão associados com a resistência ao *Plasmodium falciparum* e a susceptibilidade à *Salmonella typhimurium* (Roy et al., 2007). Sendo assim, a nossa hipótese é a de que SNPs possivelmente associados à resistência a malária poderiam favorecer a susceptibilidade a infecções micobacterianas. Um trabalho do nosso laboratório apoiou essa hipótese, encontrando a associação dos SNPs rs11264355 e rs11265459 do *PKLR* com a resistência à tuberculose na população Moçambicana (Mabunda, 2013). Recentemente, um estudo caso-controle utilizando estes mesmos SNPs na população Brasileira identificou associação com a susceptibilidade a hanseníase. O presente projeto teve como objetivo expandir a análise desse gene através do estudo de associação de novos SNPs no *PKLR*, além da validação funcional para avaliar a correlação genótipo-fenótipo em indivíduos sadios carreadores dos alelos de risco.

O estudo de SNPs no *PKLR* é realizado na tentativa de identificar marcadores genéticos principais para o desfecho da hanseníase. A formulação de um painel de marcadores

de suscetibilidade a hanseníase contribuirá para a caracterização de grupos de risco, permitindo o rastreamento dos contatos domiciliares mais suscetíveis a desenvolver o quadro clínico. Acredita-se que o *PKLR* é um forte candidato a participar desse painel. Além disso, sugerimos que o gene também participa na suscetibilidade/resistência a outras doenças infecciosas por patógenos intracelulares.

3 - OBJETIVOS

3.1 - Objetivo geral

Avaliar a associação do gene *PKLR* com a suscetibilidade a doenças micobacterianas e analisar o papel funcional desse gene no desenvolvimento da hanseníase.

3.2 - Objetivos específicos

- 1) Realizar uma busca de novas mutações e ou polimorfismos no éxon 11 do gene *PKLR* através do sequenciamento de indivíduos representativos de diferentes backgrounds genéticos;
- 2) Descrever as frequências alélicas e genotípicas dos SNPs candidatos selecionados no HapMap em uma população do Rio de Janeiro e realizar um estudo de associação entre os marcadores e a hanseníase através da comparação da distribuição de frequências entre casos e controles;
- 3) Caracterizar as frequências alélicas e genotípicas dos SNPs em uma população de Moçambique e conduzir um estudo de associação com a tuberculose para verificar se os achados em hanseníase são informativos no contexto da infecção por outra micobactéria;
- 4) Analisar os níveis de ferro sérico, ferritina, TIBC, IST, haptoglobina e atividade da enzima piruvato quinase em indivíduos sadios em busca de possíveis correlações com as variantes de risco.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Desenho de estudo

A associação genética do *PKLR* com a hanseníase na população Brasileira foi avaliada com base no desenho de estudo apresentado na Figura 4.1. A hipótese *a priori* foi formulada a partir de uma série de estudos *in vitro* e em modelos experimentais em camundongos, resultando na seleção do gene *PKLR* como candidato para o estudo de associação (Ayi et al., 2007; Roy et al., 2007). A partir daí, realizamos uma análise sistemática dos polimorfismos no *PKLR* citados na literatura e ampliamos a busca de possíveis “tag SNPs” nos bancos do HapMap e 1000Genomes para serem testados segundo a nossa hipótese. A seleção de SNPs utilizou os critérios de frequência do alelo minoritário (MAF), posição gênica e desequilíbrio de ligação (LD) na população Africana (YRI) e Europeia (CEU). Em paralelo, foi realizado o sequenciamento do éxon 11 do *PKLR* em populações com diferentes backgrounds genéticos para a busca de novos SNPs, assim como para a análise de LD entre essas populações. Os SNPs selecionados foram testados em um estudo caso-controle na população do Rio de Janeiro para avaliar a associação com a hanseníase. Em seguida, baseados na hipótese da associação do *PKLR* com patógenos intracelulares, testamos a associação destes SNPs com a tuberculose (TB) em uma população de Moçambique. Posteriormente, para fins de verificação do papel biológico dos SNPs, realizamos a dosagem hematológica de ferro, ferritina, capacidade total de ligação do ferro (TIBC), índice de saturação da transferrina e haptoglobina (IST) em indivíduos saudáveis. A haptoglobina foi mensurada também em pacientes e os dados foram analisados junto com os genótipos dos indivíduos. Por fim, a atividade da enzima PK foi caracterizada em hemácias e células mononucleares de indivíduos saudáveis na tentativa de fundamentar a relação genótipo-fenótipo.

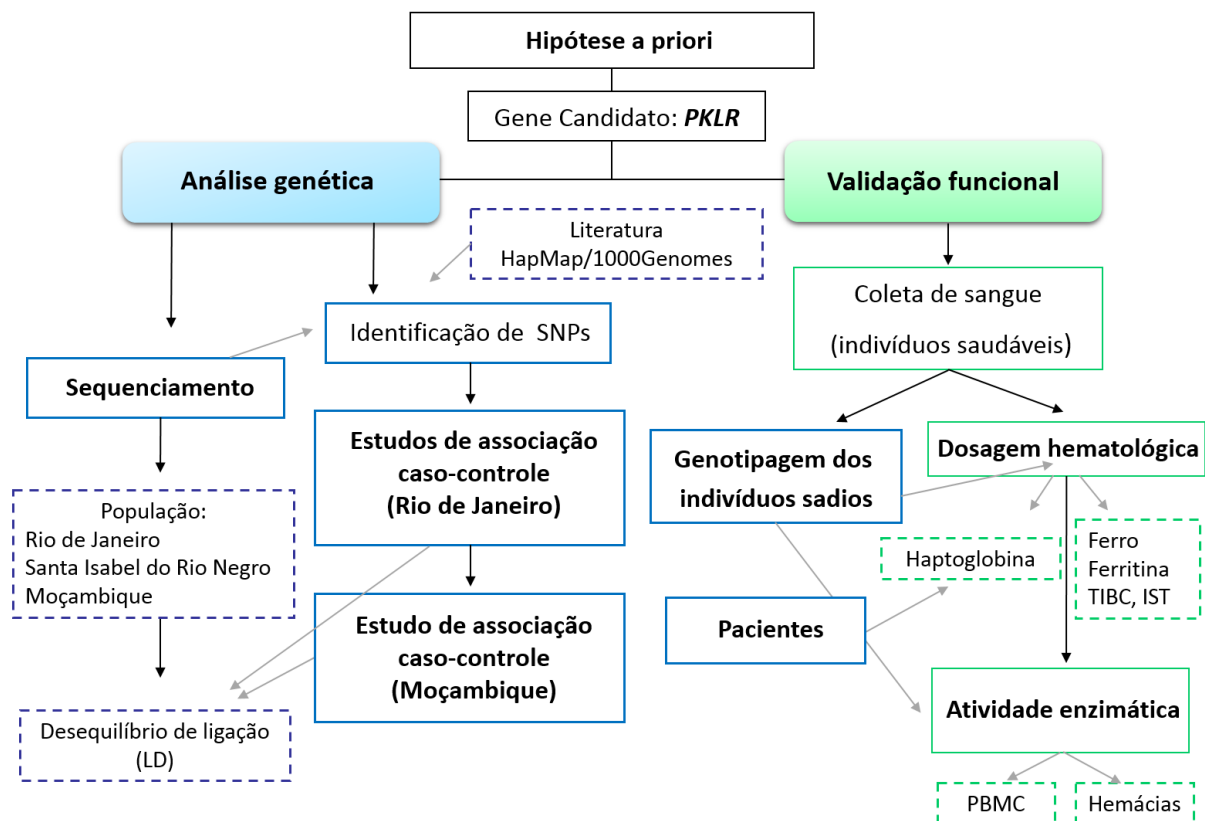


Figura 4.1 - Estratégia experimental do estudo. A partir de uma hipótese a priori, o gene *PKLR* identificado em trabalhos anteriores foi incluído neste estudo, onde foi feita uma ampla busca de SNPs candidatos no gene para o estudo de associação a doenças micobacterianas na população Brasileira e Moçambicana. O sequenciamento foi realizado a fim de identificar novos SNPs na região do *PKLR*. Também foram dosados os biomarcadores do metabolismo de Ferro e de atividade da piruvato kinase em indivíduos saudáveis, que foram correlacionados com os genótipos dos mesmos.

4.2 - Análise *in silico* – Seleção de SNPs por desequilíbrio de ligação (LD)

A análise de desequilíbrio de ligação (LD) foi realizada em populações com ancestralidade africana e europeia, representativas das populações bases que contribuíram para a construção da população Brasileira. O objetivo dessa análise foi a busca de SNPs candidatos no gene *PKLR* e regiões flangeadoras, considerando a posição dos SNPs rs11264355 e rs11264359, anteriormente estudados. Esta análise utilizou os dados das frequências alélicas e genóticas das populações do 1000Genomes e HapMap: Africanos de Yoruba (Nigéria) (YRI) e descendentes de europeus que vivem em Utah (Estados Unidos) (CEU). A construção do mapa ocorreu com auxílio do software Haploview 4.0 (Broad Institute), sendo necessárias as informações de localização dos SNPs do *PKLR*.

Posteriormente, este mesmo software foi utilizado para gerar os mapas de LD dos dados gerados no presente estudo.

O mapa de LD das populações CEU e YRI podem ser visualizados no Anexo 1. A análise utilizou estas populações a título de comparação e os SNPs foram selecionados com base na população de YRI. O critério de escolha foi baseado nos SNPs capazes de capturar a informação genética de outra região do *PKLR*, na tentativa de identificar “tag SNPs” que estejam associados com a hanseníase de forma independente. Com isso, os SNPs que não se encontram com forte desequilíbrio de ligação com os SNPs rs11264355 e rs11264359 foram selecionados. Assim, o painel geral dos SNPs de estudo foram: rs11264355, rs11264359, rs8847, rs1052176, rs7520184 e rs932972 – selecionados com base em um estudo anterior (Machado et al., 2010) – e rs4620533, rs4971072, rs8177963, rs8177970, rs2297480 e rs12032720, selecionados pela análise de LD. A lista dos SNPs, a troca alélica e a frequência do alelo minoritário (MAF) dos SNPs selecionados estão representados na Figura 4.2. Entretanto, devido a falhas técnicas, os SNPs rs7520184, rs1052176, rs8847, rs932972, rs12032720 e rs2297489 foram excluídos das análises de associação deste estudo.

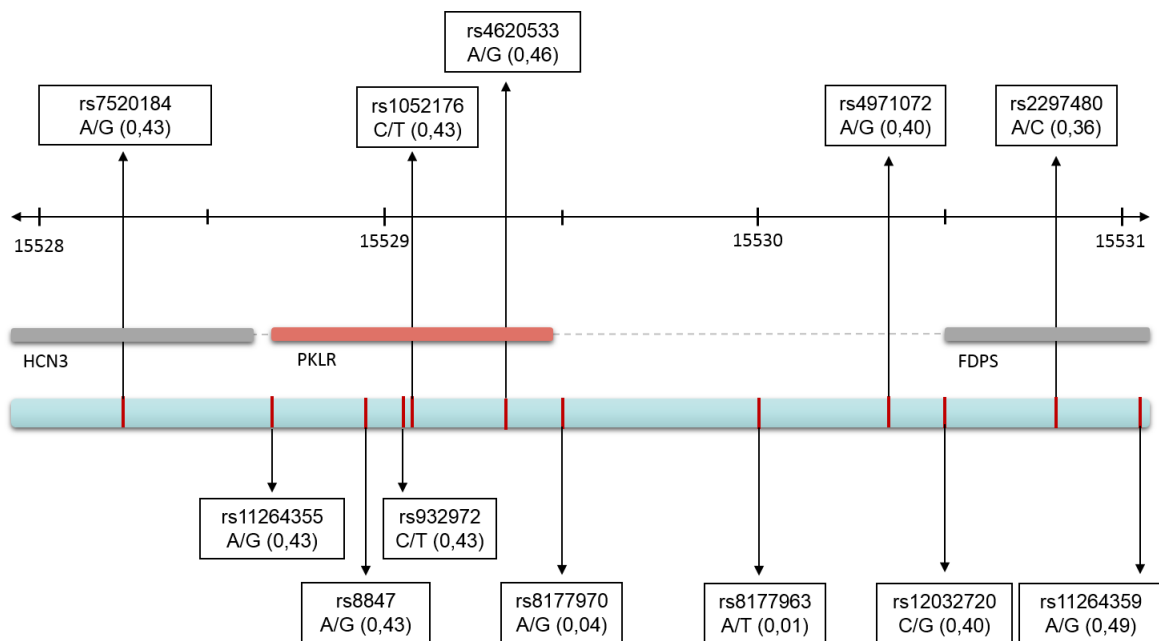


Figura 4.2 - SNPs selecionados para o estudo de associação do gene *PKLR*. MAF Global: frequência do alelo minoritário (do inglês, “Minor Allele Frequency”) na população global (correspondente a 1094 indivíduos da fase 1 do 1000Genomes).

4.3 – Grupo amostral

4.3.1 - Estudo caso-controle do Rio de Janeiro

O presente estudo incluiu uma população formada por casos e controles recrutados na cidade do Rio de Janeiro. O grupo de controles é composto por 700 indivíduos saudáveis doadores de medula óssea do Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro. Os controles são residentes da mesma área geográfica dos pacientes. O grupo de casos é formado por 890 pacientes diagnosticados com hanseníase pelo Ambulatório Souza Araújo da FIOCRUZ/RJ, considerado centro de referência para o diagnóstico clínico e tratamento de pacientes com hanseníase. Neste local, os pacientes são acompanhados regularmente mediante avaliação clínica e laboratorial. Os indivíduos foram diagnosticados com base no exame clínico, baciloscópio e histopatológico, sendo que para alguns casos foi necessário o diagnóstico por PCR. Os pacientes foram classificados segundo os critérios de classificação de Ridley e Jopling e também da classificação da OMS (paucibacilares e multibacilares). A caracterização étnica baseou-se na classificação em: caucasóide, mestiço ou negro, segundo as características morfológicas dos indivíduos e seus familiares. Esta classificação foi realizada sempre pelo mesmo profissional, através de uma inspeção cuidadosa dos atributos individuais, tais como características morfológicas da face, tipo de cabelo e cor de pele. A caracterização dessa população está descrita na Tabela 4.1. Essa população de casos e controles tem sido utilizada para estudos de associação em outras regiões do genoma e a descrição geral também pode ser visualizada em publicações recentes (Cardoso et al., 2011; de Sales-Marques et al., 2013 e de Sales-Marques et al., 2014).

Tabela 4.1 - Características gerais da população caso-controle do Rio de Janeiro. Os resultados são mostrados como n e frequência. *SD (desvio padrão).

População do Rio de Janeiro		
	Controles	Casos
Idade (média, SD*)	33,5 +/- 9,4	37,5 +/- 16,8
Sexo		
Masculino, n (frequência)	384 (0,54)	569 (0,64)
Feminino, n (frequência)	313 (0,46)	325 (0,36)
Etnia		
Caucasóides, n (frequência)	393 (0,56)	485 (0,54)
Mestiços, n (frequência)	196 (0,28)	306 (0,34)
Negros, n (frequência)	104 (0,16)	94 (0,11)
Classificação OMS		
Paucibacilar	-	274 (0,30)
Multibacilar	-	542 (0,60)

O número total de indivíduos pode ser diferente do total genotipado devido a informações faltantes (*missing*).

4.3.2 - Estudo caso-controle de Moçambique

O banco de Moçambique representa uma população africana composta por 102 casos diagnosticados com tuberculose pulmonar segundo critérios clínicos e laboratoriais, tais como sintomas respiratórios, tosse contínua por no mínimo duas semanas, perda de peso, dores no peito, febre, fraqueza e fagida. O diagnóstico foi baseado em dois resultados positivos para a baciloscopia, coloração de Ziehl-Neelsen e exames radiológicos. Os casos de TB extrapulmonar foram excluídos do estudo. Os pacientes foram recrutados de três Unidades Sanitárias da cidade e província de Maputo (Centro de Saúde de Mavalane e Polana Caniço e Hospital Geral da Machava). O grupo de controles é formado por 456 doadores do banco de sangue do Hospital Central de Maputo que não apresentaram histórico clínico sugestivo de TB. As características gerais desta população podem ser acessadas na Tabela 4.2, assim como em publicações recentes do nosso laboratório (Mabunda et al., 2013).

Tabela 4.2 - Características gerais da população de estudo caso-controle de Moçambique. Os resultados são mostrados como n e frequência. *SD (desvio padrão).

População de Moçambique		
	Controles	Casos
Idade (média, SD*)	32,3 +/- 11	33,8 +/- 13
Sexo		
Masculino, n (frequência)	364 (0,82)	57 (0,56)
Feminino, n (frequência)	82 (0,18)	45 (0,44)
Naturalidade		
Norte, n (frequência)	29 (0,06)	0 (0,00)
Centro, n (frequência)	32 (0,07)	10 (0,10)
Sul, n (frequência)	295 (0,65)	92 (0,90)

O número total de indivíduos pode ser diferente do total genotipado devido a informações faltantes (*missing*).

4.3.3 - Amostras do ensaio funcional

As amostras utilizadas para a validação funcional compreendem amostras de sangue total coletadas de um grupo de 122 indivíduos saudáveis da cidade do Rio de Janeiro. O grupo foi montado a partir do recrutamento de indivíduos sadios do Rio de Janeiro, sem grau de parentesco entre si, e que não apresentavam histórico de doenças crônicas ou inflamatórias. Estas amostras foram separadas para a atividade enzimática, coleta de soro e extração de DNA. Amostras de soro de 66 pacientes também foram recrutadas para a dosagem de haptoglobina.

4.3.4 - Considerações éticas

Os procedimentos seguidos no presente trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz (Anexo 2) - parecer N° 16836 emitido em 27/03/2012, sob responsabilidade de Dra Euzenir Nunes Sarno. Todos os doadores de amostras biológicas que aceitaram participar no trabalho assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 3). Também para a população de Moçambique,

todos os participantes concordaram em participar do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 4). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Moçambique sobre o protocolo N° 399/CNBS/11 (Anexo 5).

4.4 – Estudo de associação

4.4.1 - Extração de DNA

As amostras de DNA da população do Rio de Janeiro utilizadas no estudo de associação foram extraídas pelo método *salting out* (Miller et al., 1988), com modificações. As amostras da população de Moçambique foram extraídas a partir de sangue total pelo kit QIAamp blood DNA extraction (QIAGEN, Alemanha). Ambas as amostras já se encontravam extraídas e armazenadas a -20 °C. No caso do grupo de indivíduos incluídos na análise funcional, as amostras de DNA foram extraídas a partir de sangue total pelo método de *salting out* para a realização deste trabalho, como descrito a seguir. As amostras armazenadas no laboratório também foram extraídas por essa metodologia, como segue. Inicialmente, separou-se 500 µL de sangue total em um eppendorf de 1,5 mL e adicionou-se 1 mL de tampão de lise de hemácias (Tris-HCl 10 mM e EDTA 1mM). Em seguida, os tubos foram centrifugados a 2.800 rpm por 20 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e, novamente, os tubos receberam 1 mL de tampão de lise de hemácias. Estes tubos foram agitados no vórtex, até que se observasse a dissolução do pellet, e centrifugados a 20 minutos e a 2.500 rpm. Essa etapa correspondeu à lavagem das células para a retirada de hemácias e foi repetida de três a quatro vezes, até que se observasse um pellet claro. Em seguida, foram adicionados 200 µL do tampão de lise celular (Tris-HCl 10 mM, NaCl 400 mM, e EDTA 2 mM). Ainda, adicionou-se 20 µL de SDS (10%) e 5 µL de proteinase K para a degradação das proteínas. Os tubos foram incubados em estufa a 56 °C durante 24h. No dia seguinte, adicionou-se 200 µL da solução de acetato de sódio saturado (6,83 M) e agitou-se os tubos no vórtex. Seguiu-se à centrifugação por 15 minutos a 3.000 rpm. Após a centrifugação, duas fases foram observadas: o sobrenadante, que contém o DNA, e o precipitado, que reserva os restos orgânicos. O sobrenadante foi cuidadosamente coletado e armazenado em um *eppendorf* de 1,5 mL. Em seguida, adicionou-se etanol absoluto em volume 2 vezes o volume de sobrenadante recuperado e inverteu-se os tubos cuidadosamente. Após isso, os tubos foram centrifugados durante 15 min a 20.000 rpm e o sobrenadante foi descartado. Por fim,

adicionou-se etanol hidratado (70 %). Os tubos foram novamente centrifugados por 15 minutos a 20.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e os tubos permaneceram na estufa durante 30 minutos a 1 hora. Após a secagem do pellet, acrescentou-se 20 a 80 μ L de solução de TE (Tris-HCl 5mM e EDTA 0,1mM) para ressuspensão do DNA. Os tubos permaneceram a 56 °C durante 30 minutos na estufa para a dissolução do pellet de DNA para a quantificação.

4.4.2 - Quantificação de DNA

A avaliação da pureza e da concentração de DNA foi realizada por espectrofotometria utilizando o instrumento NanoDrop® ND-1000 (Thermo scientific, EUA). Após calibrar o aparelho com solução de TE utilizada na ressuspensão do DNA, 1 μ L de cada amostra foi lida nos comprimentos de onda de 230nm, 260 nm e 280nm. A pureza da amostra foi estimada pela razão da absorbância a 260/280, que mostra o grau de contaminação por proteínas e a 260/230, que indica o grau de contaminação por compostos orgânicos. Considerou-se amostras com alto grau de pureza quando as razões de absorbância apresentaram valores entre 1,7 e 2,0.

4.4.3 - Genotipagem por PCR em Tempo Real

A genotipagem dos SNPs ocorreu pelo sistema TaqMan® SNP Genotyping Assay (Thermo scientific, EUA) de discriminação alélica por PCR em Tempo Real. Neste sistema, um par de primers amplifica a região onde se encontra o polimorfismo e a região polimórfica é detectada por sondas fluorescentes (VIC ou FAM). Os genótipos são determinados em função da intensidade de cada fluorescência através da análise de um gráfico de discriminação alélica, conforme representado na Figura 4.3. A amplificação ocorreu em volume final de 10 μ L contendo entre 20 a 40 ng de DNA genômico e Taqman Genotyping Master Mix (40X) (Thermo scientific, EUA). Os primers e sondas apresentaram as concentrações ideais do fabricante. Os SNPs utilizados no estudo, assim como a sua localização cromossômica, estão indicados na Tabela 4.3. A reação foi programada para 60°C por 30 segundos (Pre-PCR) e 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 60°C por 1 minuto, finalizando a 60°C por 30 segundos (Pos-PCR). As corridas de PCR foram realizadas no sistema de PCR em Tempo Real StepOnePlus™ e a discriminação alélica foi visualizada no software StepOne 2.1 (Thermo scientific, EUA).

Tabela 4.3 – Caracterização dos SNPs candidatos para genotipagem em PCR em Tempo-Real.

SNP	Sequencia nucleotídica flangeadora e troca alélica	Localização	
rs11264355*	CCCTCAACCCACCCCATCCTGATA[C/G]TCTC ATACTCTTTGATATCCAACAT	Intron	155257492
rs11264359*	CTTCCAAAGGCTATTCAGAAGCAGA[A/G]ATTG AAAACCTGGCAGCTCACTGACA	Intron	155282829
rs4620533	ACCTTGTCCTGTTTCATGAGGAAAGA[C/G]AGCA GGCTAATAGAGCTACATTTCT	Intron	155262613
rs4971072	TGAGCAGGATCTTGTAATGTGGTGG[A/G]TTTA CCCAGGGGATGGACATGATCC	Intron	155273869
rs8177963	GTCTCAAAGGAGACAAAAGATGAAG[A/T]AGC ACCTCAAGAAATACCAATAGGC	Intron	155269830
rs8177970	ACGCCACAGGCGTCCTGTTACCTGA[C/T]CTTT ATTCCCTGATGCAACCCCTGC	Intron	155265661
rs2297480*	AGGGAGGGGCACTCTGGGCTAAGGC[G/T]GGG GTGGGAGTTATCTGGGGAGCTG	Intron	155279482
rs1052176*	GCGTCTCAGGATATGCTTAGCACCC[G/T]CATG ATGTTGGTGTAGCCGGAGCCA	Intron	155260383
rs932972*	GGCCTGCTGAGCAGATTGGATGCAG[A/G]GAA TGTACAATTGGTGTCTGTTGGGT	UTR3	155260096
rs7520184*	TATAAGATGAGAGAAATAAGAACT[A/G]CTTT GCATTAGCTATACATGTGTGC	Intron	155253583
rs12032720	CTGGGGTAATGCACTATCCGTTGTG[C/G]TTTA CCAACACCCTGCCATTCTT	Intron	155274960
rs8847*	CCACATGAGAGAGGGAGAAGGACCG[C/T]GTT TACCTTTAGAGTTTTGTTTTGT	UTR3	155259323

*SNP selecionado com base na literatura.

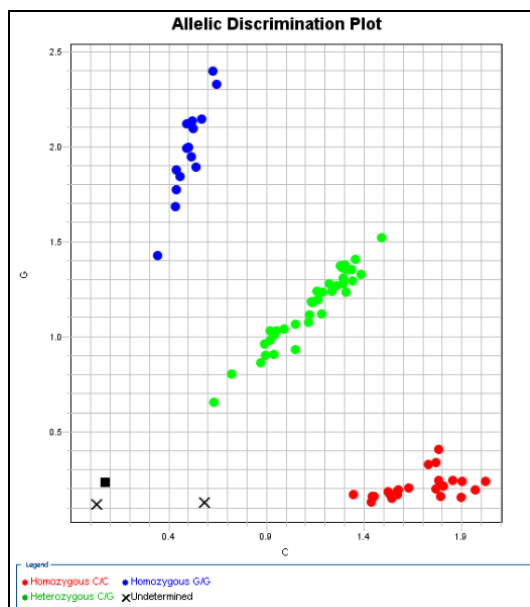


Figura 4.3 – Representação do plot de discriminação alélica do SNP rs11264355. A caracterização dos genótipos é realizada em função da intensidade dos marcadores fluorescentes associados a sondas específicas para cada alelo. Em azul: amostras de homozigotos GG; em verde: amostras de heterozigotos CG; em vermelho: amostras de homozigotos CC.

4.4.4 - Análise estatística dos dados

A primeira análise foi verificar se as populações estudadas sofreram desvio do equilíbrio de Hardy-Weimberg (HWE) através do teste do Qui-quadrado. Em seguida, as frequências alélicas, genótípicas e de carreadores entre casos e controles foram calculadas segundo o modelo de regressão logística, com ajuste para as co-variáveis sexo e etnia. As frequências dos haplótipos foram estimadas por máxima verossimilhança e comparadas utilizando os mesmos modelos de regressão aplicados aos SNPs isoladamente. A análise do presente estudo utilizou a *Odds ratio* (OR) como medida de associação com 95 % de intervalo de confiança (IC). A OR indica a razão entre a chance de exposição ao fator de risco/proteção em casos e controles. Na condição OR igual a 1, a chance entre casos e controles é a mesma, portanto não há associação entre exposição e desfecho. Valores de OR entre 0 e 1 indicam proteção, enquanto valores acima de 1 indicam que a chance está aumentada em casos, caracterizando a exposição como fator de risco. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do software R para Windows versão 3.1.1 (R Development Core Team) e dos pacotes de funções “genetics”, “haplo.stats” e “coin”. A análise de desequilíbrio de ligação (LD) utilizou o software Haploview 4.0 (Broad Institute) para a construção dos mapas das populações de CEU e YRI, utilizando a estatística r^2 para os valores de LD.

4.5 - Análise de sequenciamento

4.5.1 – Amplificação por PCR

A reação de PCR foi realizada utilizando o reagente KAPA2G Read Master Mix (Kapa Biosystems) no termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Thermo scientific, EUA). A preparação das amostras consistiu em: 2 µl de DNA genômico, 1,25 µl de primer (10µM), 12,5 µl de KAPA2G Master Mix e 8 µl de água, totalizando um volume final de 25 µl de reação. As reações foram submetidas a 40 ciclos nas condições demonstradas na Figura 4.3. Neste estudo, selecionou-se a região do éxon 11 do *PKLR* para o sequenciamento. O éxon 11 apresenta aproximadamente 1kb, portanto, para essa região foram desenhados dois pares de primers. A sequência dos primers, listados na Tabela 4.4, foram desenhados pelo software Primer3, utilizando-se como base a sequência do gene *PKLR* (Gene ID: 5313, NG_011677.1, NCBI). O fragmento do éxon 11.A e 11.B foi amplificado em temperatura ótima de anelamento de 60°C e 59°C, respectivamente.

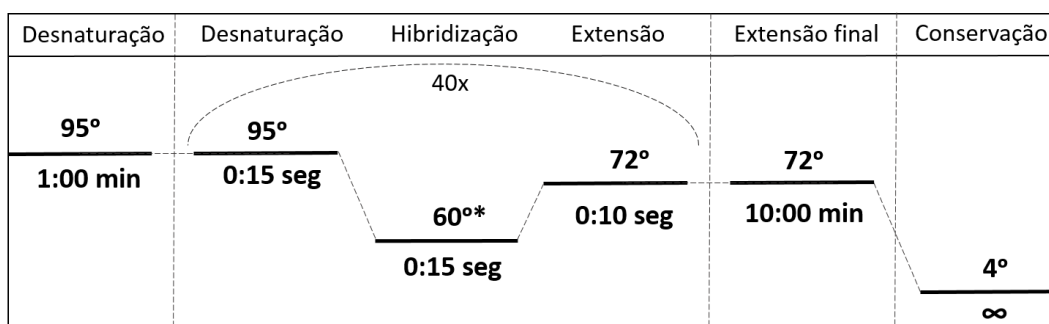


Figura 4.3 - Etapas do PCR convencional. *A temperatura ótima de hibridização (“anelamento”) foi de 60°C para o Éxon 11.A e 59°C para o Éxon 11.B.

Tabela 4.4 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores.

SNP	Primer 5' → 3'	Direção	Extensão
Éxon 11.A	5'CTTGGCTTCCCAAAGTGATG'3	F	~700pb
	5'CCAAAAGCGTGGACTTTCAT'3	R	
Éxon 11.B	5'AGGGCAATCTTGTCCACAGT'3	F	~900pb
	5'TTCCTTATTAATATGCCAGCCTAGA'3	R	

4.5.2 - Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose a 1,2% foi realizada para confirmar a amplificação do produto de PCR. A agarose foi dissolvida em TBE (Tris-borate-EDTA) 0,5X em forno microondas na proporção de 1,2 g de agarose para 100 mL de TBE 0,5X. Após a homogeneização e resfriamento, foram adicionados 5 µL de SYBR® Safe DNA Gel Stain (Thermo Scientific, EUA) para cada 100 mL de solução de TBE 0,5X. Depois da solidificação do gel, foram adicionados uma mistura de 4 µL de produto de PCR e 4 µL de corante para corrida. Aproximadamente 4 µg do padrão de peso molecular de 123 pb DNA Ladder (Thermo Scientific, EUA) foi adicionado no primeiro poço do gel. Para a corrida da eletroforese, o gel foi submetido a 100 V durante 25 minutos a temperatura ambiente. Ao final da corrida, o gel foi retirado da cuba de eletroforese e fotografado no transluminador de luz ultravioleta (L-Pix Touch, Loccus Biotecnologia, Brasil).

4.5.3 - Purificação do produto de PCR

A purificação dos produtos de PCR foi realizada utilizando o kit Purelink® pro 96 Genomic DNA Purification (Thermo Scientific, EUA). Ao volume total de produto de PCR foi adicionado 82 µL de tampão de ligação. Após homogeneizar, o conteúdo foi despejado em uma placa de filtro que foi centrifugada a 5.670 rpm por 2 minutos a temperatura ambiente. O líquido coletado foi descartado. Em seguida, realizou-se a lavagem do DNA utilizando-se o tampão de lavagem em volume final de 300 µL, seguido de centrifugação a 5.670 rpm por 2 minutos e descarte do coletado. Por último, foi adicionado 20 µL de tampão de eluição na placa de filtro acoplada a uma placa de coleta. Após incubação de 5 minutos a temperatura ambiente, a placa foi centrifugada a 5.670 rpm por 10 minutos e o DNA “puro” foi coletado. Feita a purificação, os produtos da PCR foram novamente visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,2% sob luz ultravioleta. Posteriormente a visualização da pureza das bandas em gel, foi feita a quantificação do produto da PCR em espectrofotômetro, como descrito anteriormente, para realização dos cálculos da reação de sequenciamento.

4.5.4 - Reação de sequenciamento

A reação de sequenciamento foi realizada segundo o método de dideoxynucleotídeos de Sanger et al., 1977, com modificações. Na reação foi utilizado o Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Thermo Scientific, EUA) em volume de 0,5 µL por reação. O volume final de reação foi de 10 µL e os primers utilizados foram os mesmos das reações de PCR

diluídos em 10X (3,2 pmol). Foram utilizados 20 ng do produto amplificado, conforme recomendado pela Plataforma de Sequenciamento (FIOCRUZ/RJ). A reação de sequenciamento foi corrida no termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Thermo Scientific, EUA) nas seguintes condições: 40 ciclos de 96°C a 10 minutos seguido de 50°C a 20 segundos e 60°C a 4 minutos. A leitura da reação de sequenciamento foi realizada por eletroforese capilar no sequenciador automático ABI 3130 Genetic Analyzer (Thermo Scientific, EUA) com auxílio da Plataforma Genômica de Sequenciamento de DNA – PDTIS/FIOCRUZ (RPT01A), seguindo o controle de qualidade (Otto et al., 2008).

4.5.6 - Análises dos eletroferogramas

Os eletroferogramas gerados pelo sequenciamento foram avaliados em dois softwares. A qualidade das sequências foi analisada no software BioEdit v7.2.5 (Ibis Biosciences), avaliando-se o comprimento da região sequenciada, a presença de “ruídos” e a intensidade de fluorescência dos alelos. O alinhamento e a análise comparativa foram realizados no software SeqScape v2.5 (Thermo Scientific, EUA), utilizando a sequência do gene *PKLR* (NG_011677.1, NCBI) como referência. Neste software, a presença do SNP foi avaliada nas fitas *forward* e *reverse*, observando-se a presença de um pico duplicado numa mesma posição genômica em diferentes indivíduos. O cálculo das frequências alélicas e genotípicas dos SNPs foi feita para cada população estudada, possibilitando a análise de LD nestas populações

4.6 - Dosagens hematológicas

4.6.1 - Coleta e processamento de sangue total

O sangue total dos indivíduos foi coletado na condição de jejum de 8h. A coleta ocorreu em dois tubos: um Tubo EDTA 4 mL (BD) e um Tubo Gel SST® II Advance® 8 mL (BD) com ativador de coágulo para coleta de soro. O tubo EDTA foi armazenado em freezer a - 4° C para a extração do DNA dos indivíduos. Já o tubo gel foi deixado em temperatura ambiente durante 30 minutos para a coagulação do sangue. Em seguida, os tubos foram centrifugados durante 15 minutos a 3.500 rpm e 16° C. Imediatamente após a centrifugação, o soro foi coletado e depositado em tubos de plástico devidamente etiquetados, fornecidos pelo Laboratório Sérgio Franco, e armazenados em freezer a - 70° C.

4.6.2 - Dosagens de ferro sérico, TIBC, índice de saturação da transferrina, ferritina e haptoglobina

As dosagens de ferro sérico, capacidade total de ligação do ferro (TIBC), índice de saturação da transferrina, ferritina e haptoglobina foram realizadas em colaboração com o Laboratório Sérgio Franco (Rio de Janeiro/RJ). As análises foram realizadas em soro fresco coletado do sangue total de indivíduos saudáveis. As amostras de soro foram descongeladas somente no momento da dosagem. A avaliação do Ferro sérico e da TIBC foi determinada por método colorimétrico (Sapan et al., 1999). O índice de saturação da transferrina foi calculado a partir da fórmula: ferro sérico/TIBC X 100. A ferritina foi quantificada por ensaio imunoenzimático e a haptoglobina foi medida pela técnica de nefelometria (Kober et al., 1915).

4.7 - Atividade enzimática

4.7.1 - Separação de células

A atividade enzimática da piruvato kinase foi avaliada em hemácias provenientes de sangue total e em células mononucleares (PBMC) dos indivíduos saudáveis. Nesta análise, 27 indivíduos foram utilizados. O sangue periférico de indivíduos saudáveis foi coletado em tubos EDTA de 4 mL e esse material foi separado em diferentes concentrações de hemácias e concentração total de PBMC. Primeiramente, o material do tubo EDTA (cerca de 3 mL) foi transferido para um tubo falcon e foi acrescentado 2 vezes o volume de solução PBS 1X (tampão fosfato salino). Em um outro tubo falcon (50mL) contendo 3 mL de solução Ficoll-Paque™ Premium (Thermo Scientific, EUA) a suspensão de hemácias foi adicionada cuidadosamente na parede do tubo. Essa etapa permitiu a separação das células polimorfonucleares por densidade. O tubo foi centrifugado a 2800 rpm em centrífuga sem freio durante 20 minutos a temperatura ambiente. Ao final da centrifugação foi possível observar a separação das células (hemácias no fundo) e o “anel” de PBMC, que foi cuidadosamente coletado e despejado em outro tubo. As hemácias foram usadas para a diluição seriada. Às células de PBMC foi acrescentado volume de PBS (1X) para completar o volume final do tubo, iniciando a etapa de lavagem. O tubo foi centrifugado a 2000 rpm sem freio durante 10 minutos a 4° C. Após isso, o sobrenadante foi descartado e mais volume de PBS (1X) foi adicionado, sendo importante a homogeneização do pellet celular. O tubo foi

novamente centrifugado a 2.000 rpm com pouco freio durante 10 minutos a 4° C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e seguiu-se para a fase de lise celular, em que 900 µL de água foi adicionado e imediatamente a alíquota foi congelada. Já as hemácias, contidas no fundo do tubo, foram coletadas e submetidas a uma diluição seriada. Após homogeneizar, 100 µL de sangue foi ressuspensão em um *ependorf* contendo 900 µL de água (diluição 1:10). A partir dessa ressuspensão, foram feitas mais 3 diluições de hemácias, 1:100, 1:1000 e 1:10000. A água tem o papel de lisar as células (meio hipotônico), e, por conseguinte as células foram imediatamente congeladas. O descongelamento de todas as células foi realizado no momento da leitura.

4.7.2 - Leitura da atividade da PK

A medida da atividade enzimática foi realizada em triplicatas a partir da quantificação da oxidação do NADH a NAD⁺ por absorvância em 340 nm. O meio de reação necessário para a leitura da atividade enzimática está detalhado na Tabela 4.5. As leituras foram realizadas no feitas sucessivamente durante 30 intervalos de 1 minuto. Foram preparados dois meios de reação: um “meio branco”, no qual não foi adicionado o substrato fosfoenolpiruvato (PEP), e o “meio substrato” no qual foram adicionados 80 µL de PEP. O PEP corresponde ao substrato no qual a enzima PK se acopla e realiza a produção de piruvato. Os meios reacionais foram dispostos na placa em volume final de 100 µL para 100 µL do lisado celular. O restante de células foi utilizado para a quantificação de proteínas. Todas as leituras ocorreram no Leitor de Microplaca Epoch (ELX 800) (BioTek), utilizando o software Gen5 (BioTek).

Tabela 4.5 - Meio reacional para a atividade enzimática.

Reagentes	[]	“Meio branco”	“Meio substrato”
Tris- HCl (pH= 7.4)	50 mM	400 µL	400 µL
MgCl ₂	5mM	40 µL	40 µL
KCl	100 mM	800 µL	800 µL
ADP	1 mM	0,0001 g	0,0001 g
NADH	0,5 mM	0,0006 g	0,0006 g
LDH	100 U/mL	10 µL	10 µL
PEP	1 mM	-	80 µL
H ₂ O	-	750 µL	670 µL

MgCl₂: Cloreto de magnésio; KCl: Cloreto de potássio; ADP: Difosfato de adenosina; NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo hidreto, forma reduzida; LDH: L-lactato desidrogenase e PEP: ácido fosfoenolpirúvico. Os

reagentes em gramas foram ressuspensos em 1 mL de água. Os volumes totalizam 4 mL de meio para 62 reações.

4.7.3 - Quantificação de proteínas

Para a normalização da atividade enzimática utilizamos a quantificação de proteínas dos lisados de células, realizada pelo método colorimétrico Pierce® BCA protein assay (Thermo scientific, EUA), segundo o protocolo descrito pelo fabricante. De início, preparamos o meio de reação que consiste em misturar 50 partes do reagente A (BCA em tampão bicarbonato) com uma parte do reagente B (sulfato de cobre 4%). Essa mistura formou uma solução esverdeada. Em seguida, realizou-se a disposição dos lisados e da curva padrão em duplicatas numa placa de 96 poços de fundo plano (Greiner Bio-one, Brasil). A curva padrão foi preparada a partir de uma diluição seriada de albumina a 10mg/ml (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 e 1,2 mg/ml). Foi adicionado 10 µL de lisado celular, 10 µL de curva padrão e 10 µL de “branco” (água) na placa de 96 poços. Por fim, acrescentou-se 200 µL do meio de reação (reagentes A e B), seguido de incubação a 37° C por 30 min. A leitura da placa foi realizada no leitor de placa SpectraMax 190 (Molecular Devices) no comprimento de onda de 562 nm e os resultados analisados pelo software SoftMax® (Molecular Devices, EUA).

4.7.4 - Análises estatísticas

Os resultados foram avaliados estatisticamente através do teste de Kruskal-Wallis ou teste de Mann-Whitney, conforme o número de grupos incluídos na comparação. Os valores foram considerados significativos quando o *p valor* foi igual ou inferior a 0,05. Todas as análises estatísticas da abordagem funcional foram feitas no programa GraphPad Prism versão 5 para Windows.

5. RESULTADOS

5.1 - Seleção de SNPs por sequenciamento

A primeira busca de SNPs na região do *PKLR* foi realizada através da pesquisa no HapMap. Em seguida, na tentativa de aumentar a densidade de SNPs na região do *PKLR*, utilizamos a análise de sequenciamento para identificar novos polimorfismos de baixa frequência que poderiam, eventualmente, estar presentes em um dos grupos étnicos que compõem a população Brasileira. A seleção do éxon 11 ocorreu devido à presença de mutações associadas com a deficiência da piruvato quinase em um trabalho anterior (Machado et al., 2010). O resultado do sequenciamento desse éxon identificou quatro SNPs presentes nos três grupos estudados: Moçambicanos, Amazonenses de Santa Isabel do Rio Negro e residentes do Rio de Janeiro (Figura 5.1).

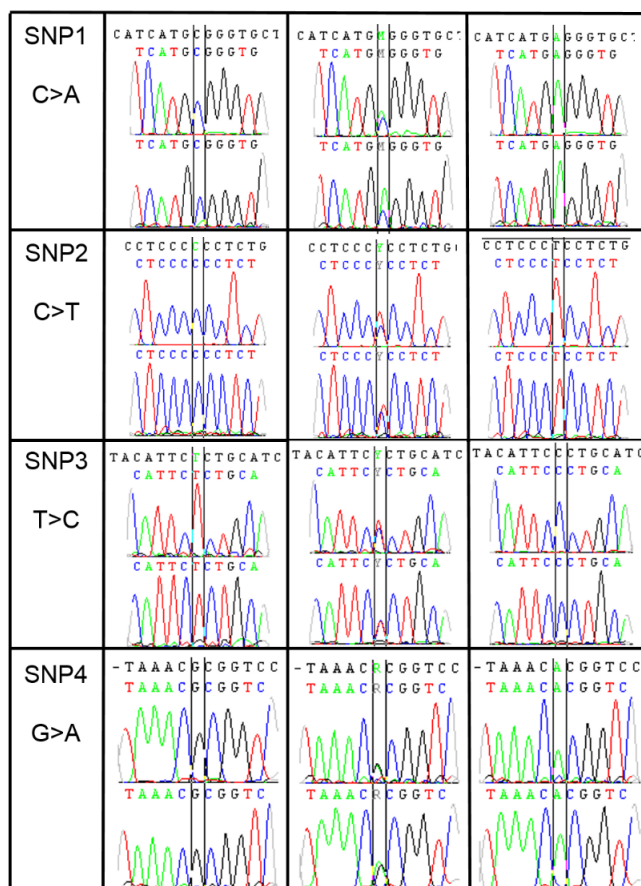


Figura 5.1 – Eletoferograma indicando a presença de SNPs no éxon 11 do *PKLR*. A coluna 1 representa o SNP e a troca alélica, coluna 2 o homocigoto majoritário, coluna 3 o heterocigoto e coluna 4 o homocigoto minoritário. A presença do SNP é observada através da sobreposição de picos no indivíduo heterocigoto. Todos os polimorfismos foram detectados nas populações do Rio de Janeiro (RJ) (N=94), Moçambique (N=96) e Santa Isabel do Rio Negro (AM) (N=80).

Através da análise do alinhamento utilizando o BLAST/NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>, RefSeq: NM_000298.5) foi possível identificar e mapear os SNPs. Todos já foram descritos na literatura: SNP1 – rs1052176; SNP2 – rs1052177; SNP3 – rs932972 e SNP4 – rs8847. As frequências absolutas destes SNPs foram então calculadas para cada população e estão representadas na Tabela 5.1. Observa-se que, exceto na população do Rio de Janeiro, os SNPs 1, 2 e 3 apresentam uma frequência elevada nas populações. No Rio de Janeiro, a frequência do homocigoto minoritário para esses SNPs varia de 3 a 4%. Já o SNP 4 não apresenta o mesmo padrão de frequências comparado aos SNPs anteriores, apresentando frequências variadas entre as três populações.

Tabela 5.1 – Frequência dos SNPs identificados no sequenciamento.

SNP	Amazonas (N=80)	Moçambique (N=96)	Rio de Janeiro (N=94)	Localização no cromossomo1	Variação molecular*
rs1052176 (SNP 1)					
CC	22 (0,28)	16 (0,17)	47 (0,50)	155290592	Sinônima
CA	44 (0,55)	48 (0,50)	43 (0,46)		
AA	14 (0,18)	32 (0,33)	4 (0,04)		
C	44 (0,55)	40 (0,42)	69 (0,73)		
A	36 (0,45)	56 (0,58)	25 (0,27)		
rs1052177 (SNP 2)					
TT	24 (0,30)	16 (0,17)	47 (0,50)	155290559	UTR-3'
TC	44 (0,55)	49 (0,51)	43 (0,46)		
CC	12 (0,15)	31 (0,32)	4 (0,04)		
T	46 (0,58)	41 (0,43)	69 (0,73)		
C	34 (0,42)	55 (0,57)	25 (0,27)		
rs932972 (SNP 3)					
CC	24 (0,30)	16 (0,17)	48 (0,51)	155290305	UTR-3'
CT	44 (0,55)	50 (0,52)	43 (0,46)		
TT	12 (0,15)	30 (0,31)	3 (0,03)		
C	46 (0,58)	41 (0,43)	69 (0,73)		
T	34 (0,42)	55 (0,57)	25 (0,27)		
rs8847 (SNP 4)					
GG	25 (0,27)	82 (0,85)	48 (0,51)	155289532	UTR-3'
GA	49 (0,53)	8 (0,08)	40 (0,42)		
AA	18 (0,20)	6 (0,06)	7 (0,07)		
G	50 (0,54)	86 (0,90)	68 (0,72)		
A	42 (0,46)	10 (0,10)	27 (0,28)		

*A variação molecular baseou-se nos dados do NCBI. O éxon 11 é a última região codificante do *PKLR*, seguido da região UTR-3'.

A análise de desequilíbrio de ligação destas populações mostrou que há a ocorrência de um bloco de SNPs com forte LD composto pelos SNPs rs1052176, rs1052177 e rs932972 em todas as populações (Figura 5.2). A rigor, os dados indicam também que o SNP rs1052176 funcionaria como “tag SNP” para todo o bloco para as análises de associação no futuro. Dessa forma, como esse SNP já havia sido genotipado na população do Rio de Janeiro anteriormente, as frequências desse SNP seriam usadas para inferir a dos demais SNPs desse bloco (rs932972 e rs1052177). Observamos ainda que o SNP rs8847 está segregando independentemente dos demais SNPs nas populações de Moçambique e de Santa Isabel do Rio Negro. Já na população do Rio de Janeiro, o SNP rs8847 apresenta tendência de LD moderado com os outros SNPs. Portanto, dos SNPs selecionados pelo sequenciamento, o único candidato para os estudos de associação foi o SNP rs8847(G>A). Entretanto, devido a falhas técnicas, a análise desse SNP não ocorreu neste trabalho.

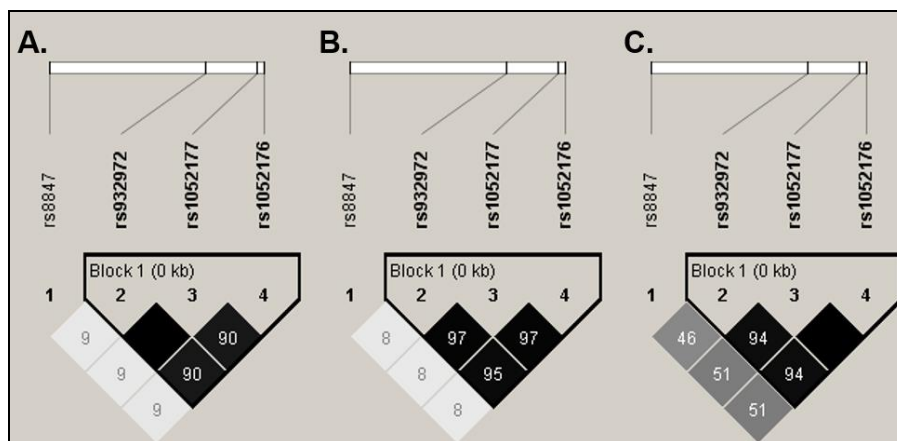


Figura 5.2 – Mapa de LD das populações de Santa Isabel do Rio Negro (A), Moçambique (B) e Rio de Janeiro (C). Os valores de LD são dados em r^2 . Os losangos apresentam uma escala de branco a preto: branco – LD fraco ($r^2 < 50$); cinza – LD moderado ($50 < r^2 < 80$) e preto – LD forte ($r^2 > 80$). Os losangos pretos sem numeração representam $r^2 = 100$.

5.2 - Estudo de associação

5.2.1 - Associação dos polimorfismos do *PKLR* com a suscetibilidade à hanseníase

Os SNPs rs11264355 e rs11264359 do *PKLR* foram anteriormente associados com a hanseníase em um estudo anterior do laboratório (de Lima Bezerra, 2013). Esse estudo, que utilizou 480 casos e 570 controles, demonstrou uma forte associação de suscetibilidade destes dois SNPs com o desenvolvimento da hanseníase na população do Rio de Janeiro. Assim, como continuação da análise de associação do *PKLR*, o número de indivíduos da população de casos e controles foi aumentado no presente estudo, e a genotipagem de novos SNPs desse gene foi realizada (rs4620533, rs4971072, rs8177970 e rs8177963).

O resultado da regressão logística para os SNPs rs11264355 e rs11264359, corrigida para as co-variáveis sexo e etnia, está sumarizado na Tabela 5.2. As frequências dos genótipos heterozigotos e GG, alelo G e carreadores de G estão aumentadas no grupo de casos em relação aos controles para ambos os SNPs. Para o SNP rs11264355, foi observada associação de risco para os genótipos CG ($OR^*=1,36$, $p=2,06 \times 10^{-2}$) e GG ($OR^*=2,38$, $p=1,39 \times 10^{-5}$), alelo G ($OR^*=1,49$, $p=1,90 \times 10^{-3}$) e carreadores do alelo G ($OR^*=1,55$, $p=6,00 \times 10^{-4}$), tanto antes quanto após as correções.

Para o SNP rs11264359, a diferença da frequência do alelo G e carreadores de G em casos e controles foi ainda maior quando comparada ao SNP rs11264355, apresentando-se maior em pacientes. A frequência do genótipo GG é duas vezes maior em casos quando comparado aos controles (0,25 vs 0,12). A regressão logística mostrou que os genótipos AG ($OR^*=1,48$, $p=4,52 \times 10^{-3}$) e GG ($OR^*=3,75$, $p=7,43 \times 10^{-12}$) estão significativamente associados com a suscetibilidade a hanseníase, com aumento de significância após as correções. Da mesma forma, o alelo G ($OR^*=1,84$, $p<0,0001$) e o carreador de G ($OR^*=1,88$, $p=1,37 \times 10^{-6}$) também apresentaram associação com o risco de desenvolvimento de hanseníase, antes e após as correções. Além disso, o efeito de dose alélica foi avaliado para os SNPs rs11264355 e rs11264359, apresentando valores significativos. Assim, aumentando-se o número de indivíduos analisados em cada grupo, a associação de suscetibilidade foi confirmada na população do Rio de Janeiro.

Tabela 5.2 - Análise de associação dos SNPs rs11264355 e rs11264359 na população do Rio de Janeiro.

SNP	Genótipo	CONTROLES	CASOS	OR (<i>p</i> valor)	IC 95%	OR* (<i>p</i> valor)	IC 95%*
<i>PKLR</i> rs11264355 C>G	CC	219 (0,44)	202 (0,34)		- Referência -		
	CG	222 (0,45)	283 (0,47)	1,38 (1,46.10⁻²)	[1,06;1,79]	1,36 (2,06.10⁻²)	[1,04;1,78]
	GG	54 (0,11)	111 (0,19)	2,22 (3,13.10⁻⁵)	[1,52;3,24]	2,38 (1,39.10⁻⁵)	[1,61;3,53]
	Alelo C	660 (0,67)	687 (0,58)		- Referência -		
	Alelo G	330 (0,33)	505 (0,42)	1,47 (2,3.10⁻³)	[1,14;1,88]	1,49 (1,9.10⁻³)	[1,14;1,88]
	Carreador G	276 (0,56)	370 (0,67)	1,54 (5,0.10⁻⁴)	[1,21;1,97]	1,55 (6,0.10⁻⁴)	[1,20;1,99]
<i>PKLR</i> rs11264359 A>G	AA	215 (0,42)	163 (0,27)		- Referência -		
	AG	242 (0,47)	275 (0,46)	1,49 (3,00.10⁻³)	[1,14;1,95]	1,48 (4,52.10⁻³)	[1,12;1,94]
	GG	60 (0,12)	157 (0,26)	3,45 (1,63.10⁻¹¹)	[2,40;4,94]	3,75 (7,43.10⁻¹²)	[2,57;5,47]
	Alelo A	672 (0,65)	601 (0,51)		- Referência -		
	Alelo G	362 (0,35)	589 (0,49)	1,81 (<0,0001)	[1,42;2,31]	1,84 (<0,0001)	[1,44;2,36]
	Carreador G	302 (0,59)	432 (0,72)	1,88 (7,2.10⁻⁷)	[1,46;2,42]	1,88 (1,37.10⁻⁶)	[1,45;2,43]

Os dados estão apresentados em N (frequência) dos genótipos, alelos e de carreadores do alelo minoritário em casos e controles. *Valores de OR corrigidos para sexo e etnia. IC = Intervalo de confiança. Em negrito são marcados os resultados estatisticamente significativos. SNP rs11264355 - NCONTROLES=495 e NCASOS=596 e rs11264359 - NCONTROLES=517 e NCASOS=595.

Os SNPs apresentados na Tabela 5.3 (rs4620533, rs4971072, rs8177963 e rs8177970) foram selecionados a partir das análises de LD nas populações do HapMap. O SNP rs4620533 (C>G) encontra-se em equilíbrio de HWE dentre os controles. O alelo G encontra-se duas vezes mais frequente em casos, e observa-se que essa diferença ocorre devido à maior frequência do genótipo GG em casos, já que o genótipo CG se mantém constante entre os grupos. A associação de suscetibilidade foi significativa para os genótipos CG (OR*=1,31, $p=3,95 \times 10^{-2}$) e GG (OR*=2,74, $p=3,07 \times 10^{-8}$), alelo G (OR*=1,58, $p=1,00 \times 10^{-4}$) e carreadores de G (OR*=1,58, $p=3,00 \times 10^{-4}$), antes e após as correções pelas co-variáveis sexo e etnia.

A análise do SNP rs4971072 (A>G) mostrou que as frequências alélicas e genotípicas não sofreram desvio de HWE em controles. Este SNP apresentou uma associação significativa em direção ao risco para o genótipo GG (OR*=2,90, $p=3,65 \times 10^{-10}$), o que não ocorreu para o genótipo AG. A associação de risco foi vista também para o alelo G (OR*=1,71, $p<0,0001$) e

carreador de G ($OR^*=1,58$, $p=6,00 \times 10^{-4}$), antes e após as correções. Conjuntamente, foi verificado que a presença do alelo G para todos os SNPs vistos até então (rs11264355, rs11264359, rs4620533 e rs4971072) tem papel relevante na suscetibilidade a hanseníase na população do Rio de Janeiro. Além disso, observamos que houve efeito de dose alélica para estes quatro SNPs com p valor significativo.

O SNP rs8177970 (T>C) apresentou uma frequência do alelo minoritário de 0,02 em controles e 0,05 em casos. Foi verificada a associação de risco para o genótipo CC ($OR^*=2,92$, $p=0,002$), alelo C ($OR^*=2,46$, $p=0,05$) e carreador de C ($OR^*=2,73$, $p=0,003$). Devido à baixa frequência deste SNP, ele não foi utilizado para a análise de haplótipo. O SNP rs8177963 (A>C), entretanto, apresentou uma frequência muito baixa na população estudada ($<0,005$), inviabilizando a análise por regressão logística. Por este motivo, este SNP também foi excluído da análise de haplótipo.

Tabela 5.3 - Análise de associação para os SNPs rs4620533, rs4971072, rs8177963 e rs8177970 na população do Rio de Janeiro.

SNP	Genótipo	CONTROLES	CASOS	OR (p valor)	IC 95%	OR* (p valor)	IC 95%*
<i>PKLR</i> rs4620533 C>G	CC	239 (0,40)	172 (0,30)	- Referência -			
	CG	281 (0,47)	272 (0,47)	1,34 (2,39.10⁻²)	[1,03;1,73]	1,31 (3,95.10⁻²)	[1,01;1,70]
	GG	74 (0,12)	138 (0,24)	2,59 (5,66.10⁻⁸)	[1,83;3,65]	2,74 (3,07.10⁻⁸)	[1,91;3,92]
	Alelo C	759 (0,64)	616 (0,53)	- Referência -			
	Alelo G	429 (0,36)	548 (0,47)	1,57 (1,00.10⁻⁴)	[1,24;1,98]	1,58 (1,00.10⁻⁴)	[1,25;2,01]
	Carreador G	355 (0,56)	410 (0,71)	1,60 (1,28.10⁻⁴)	[1,25;2,04]	1,58 (3,00.10⁻⁴)	[1,23;2,02]
	<i>PKLR</i> rs4971072 A>G	AA	194 (0,32)	139 (0,23)	- Referência -		
AG		297 (0,49)	256 (0,42)	1,20 (0,18)	[0,91;1,58]	1,17 (0,24)	[0,89;1,55]
GG		110 (0,18)	213 (0,35)	2,70 (7,76.10⁻¹⁰)	[1,96;3,71]	2,90 (3,65.10⁻¹⁰)	[2,08;4,05]
Alelo A		685 (0,57)	534 (0,44)	- Referência -			
Alelo G		517 (0,43)	682 (0,56)	1,69 (<0,0001)	[1,34;2,12]	1,71 (<0,0001)	[1,35;2,16]
Carreador G		407 (0,67)	469 (0,77)	1,60 (3,00.10⁻⁴)	[1,24;2,07]	1,58 (6,00.10⁻⁴)	[1,21;2,05]
<i>PKLR</i> rs8177970 T>C	TT	455 (0,96)	193 (0,91)	- Referência -			
	TC	17 (0,04)	20 (0,09)	NA	NA	NA	NA
	CC	1 (0,00)	0 (0,00)	2,77 (0,002)	[1,42;5,41]	2,92 (0,002)	[1,47;5,80]
	Alelo T	927 (0,98)	406 (0,95)	- Referência -			
	Alelo C	18 (0,02)	20 (0,05)	2,40 (0,57)	[0,97;5,93]	2,46 (0,05)	[0,97;6,19]
	Carreador C	18 (0,04)	20 (0,09)	2,61 (0,04)	[1,35;5,06]	2,73 (0,003)	[1,39;5,36]
<i>PKLR</i> rs8177963 A>C	AA	520 (1,00)	246 (0,99)	- Referência -			
	AC	1 (0,00)	2 (0,01)	NA	NA	NA	NA
	CC	0 (0,00)	0 (0,00)	NA	NA	NA	NA
	Alelo A	1041 (1,00)	494 (0,00)	- Referência -			
	Alelo C	1 (0,00)	2 (0,00)	NA	NA	NA	NA
	Carreador C	1 (0,00)	2 (0,00)	NA	NA	NA	NA

Os dados estão apresentados em N (frequência) dos genótipos, alelos e de carreadores do alelo minoritário em casos e controles. *Valores de OR corrigidos para sexo e etnia. IC = Intervalo de confiança. Em negrito são marcados os resultados estatisticamente significativos. NA= Ausência de associação. SNP rs4620533 - NCONTROLES=594 e NCASOS=582; rs4971072 - NCONTROLES=601 e NCASOS=608; SNP rs8177970 - NCONTROLES=473 e NCASOS=213 e SNP rs8177963 -NCONTROLES=521 e NCASOS=248.

Com os dados das frequências dos SNPs estudados, realizamos a análise de desequilíbrio de ligação dos indivíduos controles do Rio de Janeiro, que evidenciou valores de LD moderados entre os SNPs rs4620533, rs4971072, rs11264355 e 11264359 (variando o valor de r^2 de 55 a 66) (Figura 5.3). Diferente da população africana de YRI (HapMap) utilizada para a seleção de SNPs (Anexo 1), em que o SNP rs4971072 não está em LD com os outros três SNPs, aqui observamos que ele está em LD moderado com rs4620533 e rs11264359 e fraco com rs11264355. Os SNPs rs8177970 e rs8177963 não se encontram em LD com outros SNPs.

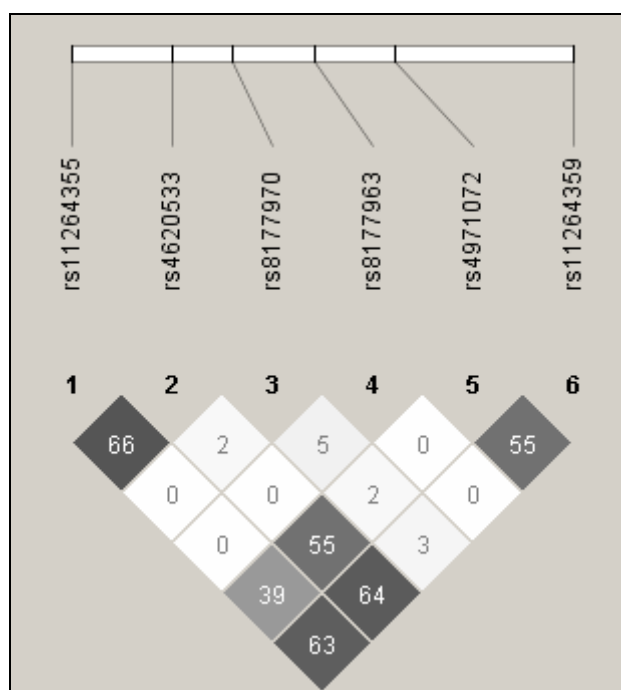


Figura 5.3 – Desequilíbrio de ligação dos SNPs estudados na população de controles do Rio de Janeiro. Os losangos apresentam uma escala de branco a preto: branco – LD fraco ($r^2 < 50$); cinza – LD moderado fraco ($50 < r^2 < 80$) e preto – LD forte ($r^2 > 80$).

Em seguida, realizamos o estudo dos haplótipos na população do Rio de Janeiro. A análise de haplótipos resultou em três combinações associadas com a suscetibilidade a hanseníase, antes e após as correções pelas co-variáveis sexo e etnia. A Tabela 5.4 representa os resultados das estimativas de frequência e análise de regressão logística para os haplótipos, utilizando como base o haplótipo mais frequente C/A/C/A (rs11264355/rs11264359/rs4620533/rs4971072). A associação de risco com a hanseníase foi observada para a combinação de alelos C/G/C/G ($OR^* = 2,68$, $p = 0,009$) e C/G/G/G ($OR^* = 1,75$, $p = 0,03$). O haplótipo G/G/G/G ocorre com frequência elevada em ambos os

grupos, sendo que em casos a frequência é mais alta comparada aos controles (39% vs 27%, respectivamente). Esse haplótipo apresentou o valor de OR significativamente associado ao risco (OR*=1,86, $p<0,00001$), corroborando os achados individuais para os quatro SNPs, cujo alelo G é responsável pela associação de risco. Curiosamente, observa-se que para os três haplótipos associados à hanseníase, o alelo G correspondente aos SNPs rs11264359 e rs4971072 estão sempre presentes (na segunda e quarta posição do haplótipo). Ainda, o haplótipo C/G/C/G apresenta o maior valor de OR=2,68, indicando que o alelo rs11264359G e rs4971072G conseguem capturar significativamente a informação de risco. Ou seja, haplótipos formados por apenas esses dois SNPs (rs11264359/rs4971072) geram 2 haplótipos majoritários A/A (51% em controles e 40% em casos) e G/G (30% em controles e 44% em casos), onde a presença da combinação G/G parece ser suficiente para explicar a suscetibilidade à hanseníase.

Tabela 5.4 - Análise de associação de haplótipos na população do Rio de Janeiro.

Haplótipos	Alelos	Controles	Casos	OR (<i>p</i> valor)	IC 95%	OR* (<i>p</i> valor)	IC 95%*
	C/A/C/A	0,51	0,40	- Referência -			
rs11264355/ rs11264359/ rs4620533/ rs4971072	C/A/C/G	0,07	0,07	1,23 (0,20)	[0,89;1,70]	1,24 (0,18)	[0,89;1,73]
	C/G/C/G	0,01	0,02	2,48 (0,01)	[1,20;5,12]	2,68 (0,009)	[1,27;5,66]
	C/G/G/G	0,02	0,03	1,57 (0,07)	[0,95;2,58]	1,75 (0,03)	[1,04;2,92]
	G/A/G/A	0,01	0,008	0,88 (0,77)	[0,75;3,44]	0,83 (0,68)	[0,35;1,97]
	G/A/G/G	0,01	0,01	1,30 (0,42)	[0,20;1,78]	1,48 (0,25)	[0,75;2,89]
	G/G/G/G	0,27	0,39	1,81 (<0,00001)	[1,51;2,19]	1,86 (<0,00001)	[1,53;2,25]

Os dados apresentam a frequência dos haplótipos em casos e controles. Os haplótipos com frequência menor que 1% em controles não foram mostrados. * Valores de OR corrigidos para sexo e etnia. IC = Intervalo de confiança. Em negrito são marcados os resultados estatisticamente significativos ($p<0,05$).

Assim, resolvemos visualizar o dado de haplótipos combinando somente os SNPs rs11264359 e rs4971072 (Tabela 5.5). A frequência do haplótipo rs11264355G/rs4971072G é alta em controles (0,32) e ainda maior em casos (0,47). A análise de regressão mostrou que o haplótipo formado pelos alelos G/G está associado à suscetibilidade a hanseníase (OR*=1,89, $p<0,00001$). Entretanto, essa associação não é vista para as combinações dos alelos A/G e G/A, pouco frequentes na população, indicando que a ocorrência do alelo G para somente um dos SNPs não é suficiente para resultar em associação. Apesar da presença do alelo G para o

SNP rs11264359 ter mostrado associação com a hanseníase no haplótipo rs11264355C/rs11264359G/rs4620533C/rs4971072A, na comparação de haplótipos rs11264359/rs4971072 isso não ocorreu. Com isso, sugerimos que a presença dupla do alelo G referente aos SNPs rs11264359 e rs4971072 pode estar dirigindo a associação. Ou seja, independente da presença de outros polimorfismos no haplótipo, a presença destes SNP leva à suscetibilidade. Isso indica que estes SNPs são os que provavelmente apresentam-se como “tagSNPs” para a associação.

Tabela 5.5 - Análise de associação dos haplótipos rs11264359/rs4971072 na população do Rio de Janeiro.

	Alelos	Controles	Casos	OR (p valor)	IC 95%	OR* (p valor)	IC 95%*
Haplótipos rs11264359/ rs4971072	A/A	0,54	0,41	- Referência -			
	A/G	0,10	0,09	1,14 (0,34)	[0,86;1,52]	1,18 (0,25)	[0,88;1,59]
	G/A	0,02	0,02	1,21 (0,46)	[0,71;2,08]	1,30 (0,33)	[0,75;2,23]
	G/G	0,32	0,47	1,83 (<0,00001)	[1,54;2,17]	1,89 (<0,00001)	[1,58;2,26]

Os dados apresentam a frequência dos haplótipos em casos e controles. Os haplótipos com frequência menor que 1% em controles não foram mostrados. * Valores de OR corrigidos para sexo e etnia. IC = Intervalo de confiança. Em negrito são marcados os resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

5.2.2 – Associação dos polimorfismos do *PKLR* com a tuberculose

Estudos anteriores desenvolvidos em colaboração com a nossa equipe demonstraram a associação dos SNPs rs11264355 (G>C) e rs11264359 (G>A) com a tuberculose em uma população de Moçambicanos (Mabunda, 2013). Nesse estudo, os carreadores do alelo C (rs11264355, OR*=0,54 e $p=0,01$) e do alelo A (rs11264359, OR*=0,46 e $p=0,004$) foram associados à proteção ao desenvolvimento de tuberculose ativa. A título de comparação, as tabelas desse estudo foram reanalisadas aqui, corrigindo para as co-variáveis sexo e idade, e os dados estão representados na Tabela 5.6. Observamos que para o SNP rs11264355 na população de Moçambique há maior frequência de indivíduos CC em controles (0,18) do que em pacientes (0,11). Também, para o rs11264355 há maior frequência de indivíduos AA (0,08) em controles comparado aos pacientes (0,02), justificando a associação de proteção identificada anteriormente. Curiosamente, o alelo G para ambos SNPs é majoritário na população de Moçambicanos e minoritário na população do Rio de Janeiro, cuja associação verificada foi em direção ao risco a hanseníase. A variabilidade das frequências destes SNPs nas duas populações com características genéticas distintas pode estar sugerindo que o *locus* do *PKLR* está sofrendo uma pressão seletiva.

Aprofundando a compreensão da associação encontrada em Moçambique, neste trabalho realizamos a genotipagem dos SNPs rs4620533 e rs4971072 na população de Moçambicanos (Tabela 5.5). Como resultado, o SNP rs4620533 (G>C) apresentou-se de acordo com o equilíbrio de HWE, porém não apresentou associação com a tuberculose. As frequências alélicas, genotípicas e de carreador não apresentaram diferenças expressivas entre casos e controles. No caso do SNP rs4971072 (G>A), não foi possível estabelecer associação genética com a doença, pois o SNP é pouco frequente e parece estar sofrendo processo de fixação. O alelo G apresenta frequência majoritária (~100%) em ambos os grupos. As frequências alélicas e genotípicas desviaram do equilíbrio de HWE em casos e controles.

Tabela 5.6 – Análise de associação para os SNPs rs11264355, rs11264359, rs4620533 e rs4971072 na população de Moçambique.

SNP	Genótipo	CONTROLES	CASOS	OR (p valor)	IC 95%	OR* (p valor)	IC 95%*
<i>PKLR</i> rs11264355 G>C	GG	116 (0,31)	39 (0,43)		- Referência -		
	GC	190 (0,51)	42 (0,46)	0,65 (0,09)	[0,40;1,07]	0,58 (0,04)	[0,35;0,98]
	CC	66 (0,18)	10 (0,11)	0,45 (0,03)	[0,21;0,96]	0,40 (0,02)	[0,18;0,88]
	Alelo G	422 (0,57)	120 (0,66)		- Referência -		
	Alelo C	322 (0,43)	62 (0,34)	0,67 (0,11)	[0,40;1,09]	0,63 (0,07)	[0,38;1,04]
	Carreador C	256 (0,69)	52 (0,57)	0,60 (0,03)	[0,37;0,96]	0,54 (0,01)	[0,33;0,88]
<i>PKLR</i> rs11264359 G>A	GG	183 (0,58)	69 (0,73)		- Referência -		
	GA	109 (0,34)	24 (0,25)	0,58 (0,04)	[0,34;0,98]	0,51 (0,01)	[0,29;0,88]
	AA	24 (0,08)	2 (0,02)	0,22 (0,04)	[0,05;0,96]	0,24 (0,06)	[0,05;1,11]
	Alelo G	475 (0,75)	162 (0,85)		- Referência -		
	Alelo A	157 (0,25)	28 (0,15)	0,52 (0,04)	[0,28;0,97]	0,50 (0,03)	[0,26;0,95]
	Carreador A	133 (0,42)	26 (0,27)	0,51 (0,01)	[0,31;0,85]	0,46 (0,004)	[0,27;0,79]
<i>PKLR</i> rs4620533 G>C	GG	173 (0,53)	47 (0,53)		- Referência -		
	GC	130 (0,40)	39 (0,44)	1,10 (0,68)	[0,68;1,78]	1,11 (0,67)	[0,67;1,83]
	CC	25 (0,08)	3 (0,03)	0,44 (0,19)	[0,12;1,52]	0,54 (0,34)	[0,15;1,94]
	Alelo G	476 (0,73)	133 (0,75)		- Referência -		
	Alelo C	180 (0,27)	45 (0,25)	0,89 (0,68)	[0,52;1,52]	0,94 (0,84)	[0,54;1,64]
	Carreador C	155 (0,48)	42 (0,47)	0,99 (0,99)	[0,62;1,59]	1,03 (0,89)	[0,63;1,68]
<i>PKLR</i> rs4971072 G>A	GG	342 (0,97)	90 (1,00)		- Referência -		
	GA	6 (0,02)	0 (0,00)	NA	NA	NA	NA
	AA	2 (0,01)	0 (0,00)	NA	NA	NA	NA
	Alelo G	690 (0,98)	180 (1,00)		- Referência -		
	Alelo A	12 (0,02)	0 (0,00)	NA	NA	NA	NA
	Carreador A	13 (0,03)	0 (0,00)	NA	NA	NA	NA

1

¹Os dados estão apresentados em N (frequência) dos genótipos, alelos e de carreadores do alelo minoritário em casos e controles. *Valores de OR corrigidos para sexo e etnia. IC= Intervalo de confiança. NA= Ausência de associação. Em negrito são marcados os resultados estatisticamente significativos. O estudo de associação dos SNPs rs11264355 e rs11264359 foram publicados na dissertação de Mabunda, 2013. Estes dados foram

O mapa de LD da população Moçambicana mostrou que os SNPs rs11264355 e rs11264359 apresentam-se com desequilíbrio de ligação baixo ($r^2=13$) e a maioria dos SNPs não estão em desequilíbrio de ligação entre eles (Figura 5.4). Comparando à população africana de YRI (HapMap), -p01 algumas diferenças foram observadas. Em YRI, foi visto um LD moderado entre os SNPs rs4620533 e rs11264359 ($r^2=58$) e rs4620533 e rs11264355 ($r^2=69$), o que não ocorre em Moçambique, na qual todos os marcadores apresentaram segregação independente.

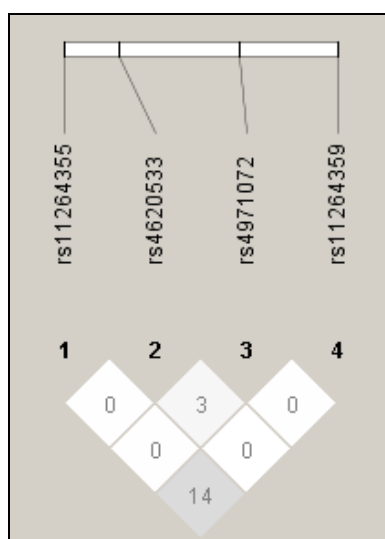


Figura 5.4 - LD dos SNPs de *PKLR* na população de controles de Moçambique. Os SNPs rs8177970 e rs8177963 não foram genotipados nesta população devido à baixa frequência. Os losangos apresentam uma escala de branco a preto: branco – LD fraco ($r^2<50$); cinza – LD moderado fraco ($50<r^2<80$) e preto – LD forte ($r^2>80$).

A análise de haplótipos na população africana mostrou uma maior variedade de combinações alélicas que ocorrem frequentemente na população (Tabela 5.7). Nesta análise, o SNP rs4971072 foi excluído em virtude de sua baixa frequência. Isso significa que independente da combinação haplotípica entre os SNPs, o alelo rs4971072G estará presente, não sendo informativo para qualquer inferência de associação. Como resultado, nenhuma das combinações apresentou associação com a TB. O haplótipo G/G/G foi utilizado como referência devido à sua maior frequência na população, o que nos impede de observar uma

analisados novamente neste trabalho para estruturar a comparação. SNP rs11264355 - NCONTROLES=372 e NCASOS=91; rs11264359 - NCONTROLES=316 e NCASOS=95; SNP rs4620533 - NCONTROLES=328 e NCASOS=89 e SNP rs4971072 -NCONTROLES=351 e NCASOS=90.

possível associação desta combinação com o desfecho. De fato, observa-se que a frequência desse haplótipo é de 36% em controles e 48% em casos, o que sugere que exista um efeito de risco semelhante ao observado no estudo em hanseníase. Com isso, os resultados de associação na população de Moçambique e no Rio de Janeiro se complementam.

Tabela 5.7 – Análise de associação dos haplótipos rs11264355/rs11264359/rs4971072 na população de Moçambique.

Haplótipos	Alelos	Controles	Casos	OR (p valor)	IC 95%	OR* (p valor)	IC 95%*	
rs11264355/ rs11264359/ rs4620533/	C/A/C	0,04	0,03	0,64 (0,46)	[0,19;2,11]	0,54 (0,33)	[0,15;1,91]	
	C/A/G	0,14	0,10	0,56 (0,94)	[0,29;1,10]	0,58 (0,12)	[0,28;1,16]	
	C/G/C	0,06	0,03	0,45 (0,25)	[0,10;1,77]	0,39 (0,29)	[0,07;2,22]	
	C/G/G	0,17	0,15	0,68 (0,21)	[0,28;1,06]	0,69 (0,28)	[0,35;1,35]	
	G/A/C	0,02	0,00	NA	NA	NA	NA	
	G/A/G	0,04	0,00	NA	NA	NA	NA	
	G/G/C	0,14	0,17	0,93 (0,83)	[0,48;1,80]	1,18 (0,65)	[0,55;2,50]	
	G/G/G	0,36	0,48	- Referência -				

Os dados apresentam a frequência dos haplótipos em casos e controles. Os haplótipos com frequência menor que 1% em controles não foram mostrados. * Valores de OR corrigidos para sexo e idade. IC = Intervalo de confiança. NA = Ausência de associação. Em negrito são marcados os resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

5.3 – Análise Funcional

5.3.1 – Caracterização dos níveis séricos de ferro, ferritina, TIBC e índice de saturação da transferrina em função dos genótipos

Após a análise genética, foi feita a dosagem dos parâmetros relacionados ao metabolismo de ferro na tentativa de associar os SNPs ao aspecto clínico. Para esse fim, foram realizadas diferentes comparações. Inicialmente, os indivíduos foram estratificados tendo como base os genótipos dos SNPs utilizados neste estudo e comparados segundo o nível de ferro produzido. Para essas análises foram utilizadas amostras de voluntários sadios sem antecedência de alcoolismo ou doenças hepáticas. O primeiro resultado, demonstrado na

Figura 5.5, permitiu observar que a distribuição das concentrações de Ferro sérico por genótipo é homogênea. Nesse caso, não foram identificadas diferenças significativas que indicassem associação entre a dosagem de ferro e os SNPs avaliados.

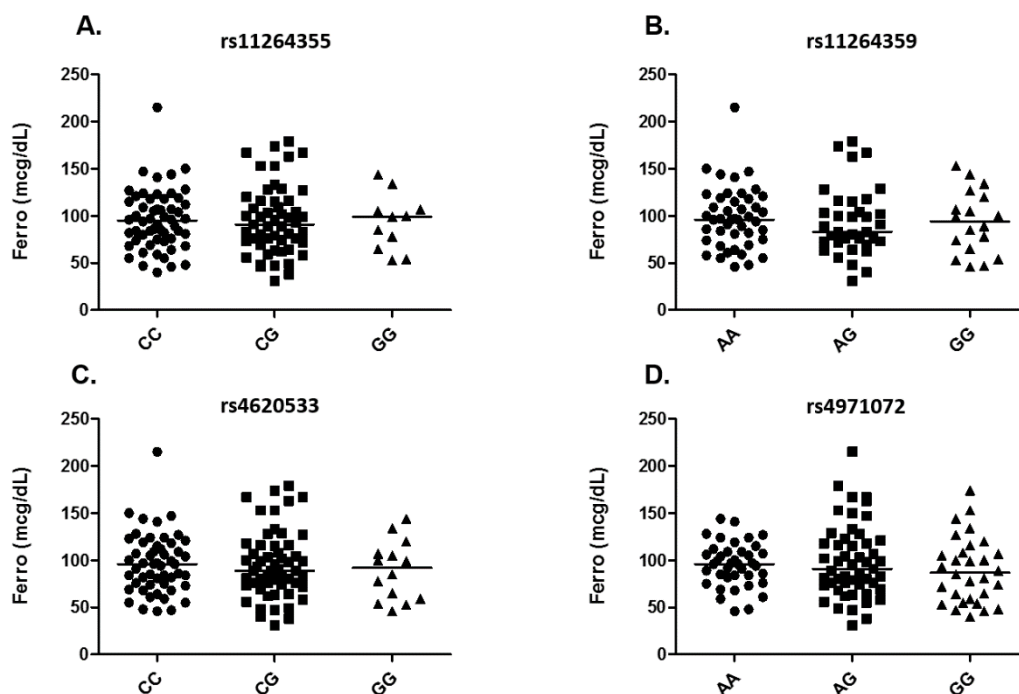


Figura 5.5 - Distribuição dos níveis de ferro sérico (mcg/dL) em função dos genótipos por SNP. As barras horizontais representam a mediana. **A.** SNP rs11264355 (N_{CC}=56, N_{CG} =53, N_{GG}=11). **B.** SNP rs11264359 (N_{AA}=45, N_{AG} =35, N_{GG}=18). **C.** SNP rs4620533 (N_{CC}=52, N_{CG} =55, N_{GG}=14). **D.** SNP rs4971072 (N_{AA}=39, N_{AG} =51, N_{GG}=30).

Em seguida, partimos para a investigação através da divisão das concentrações de ferro por intervalos e comparamos entre os genótipos dos SNPs. Para isso, os intervalos foram delimitados com base nos valores de referência do Laboratório Sérgio Franco, bem como no padrão de distribuição geral de ferro (dado não mostrado). A ideia foi a de verificar a distribuição dos genótipos ao longo dos intervalos de concentração. Assim, conforme exposto na Figura 5.6, independente do genótipo, a maioria dos indivíduos apresentou níveis séricos de ferro na concentração de 66-115 (mcg/dL). Ainda, este intervalo concentra a maior frequência de indivíduos GG para todos os SNPs analisados. Não foi visto número expressivo de indivíduos que extrapolem o intervalo de 166-215 (mcg/dL), onde a concentração de Ferro ultrapassa os limites de referência. Curiosamente, é visto uma frequência sutilmente aumentada de indivíduos GG (28%) na faixa 116-165 (mcg/dL) para o SNP rs11264359.

Além disso, observa-se que 3% dos indivíduos GG referente ao SNP rs4971072 compõem o intervalo de 166-215 (mcg/dL), sendo que para os outros SNPs este intervalo não apresenta indivíduos GG.

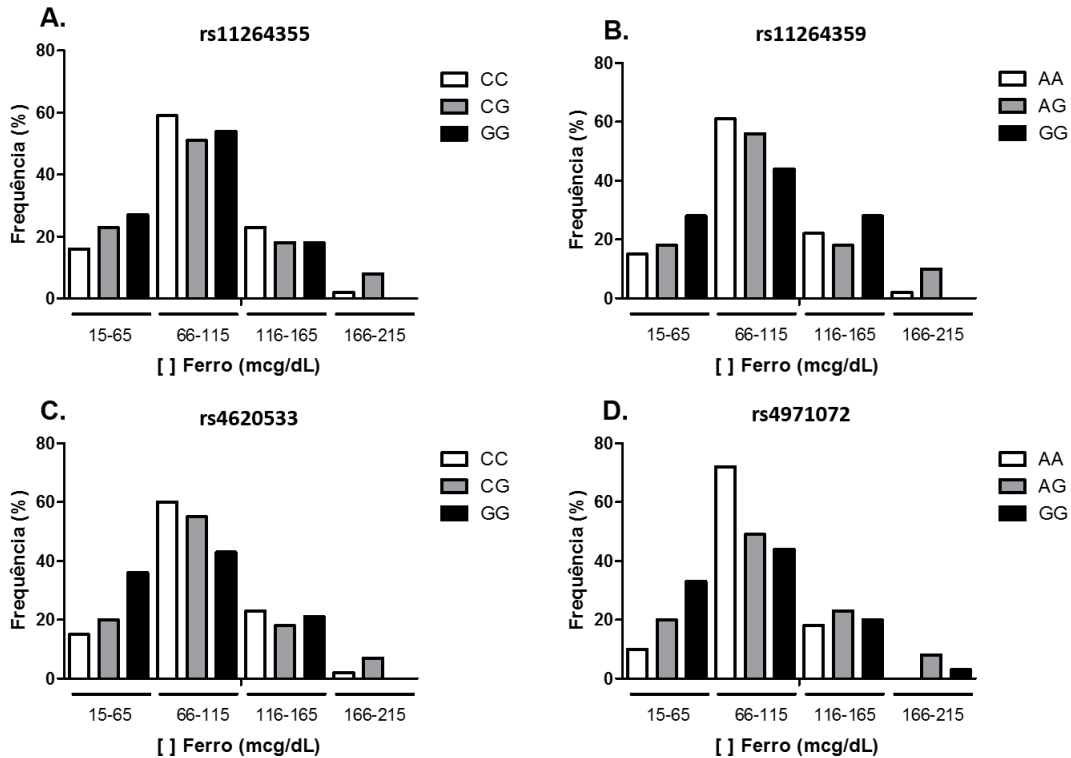


Figura 5.6 - Frequência dos níveis de ferro sérico (mcg/dL) por intervalos de concentração em função do genótipo. As barras horizontais representam a frequência (%), calculada pelo número de indivíduos homocigotos majoritários, minoritários ou heterocigotos referentes a cada faixa de concentração pelo total de indivíduos homocigotos majoritários, minoritários ou heterocigotos. As faixas de concentração estão dentro do limite de normalidade para este parâmetro. **A.** SNP rs11264355 ([15-65]: $N_{CC}=16\%$, $N_{CG}=23\%$, $N_{GG}=27\%$; [66-115]: $N_{CC}=59\%$, $N_{CG}=51\%$, $N_{GG}=54\%$; [116-165]: $N_{CC}=23\%$, $N_{CG}=18\%$, $N_{GG}=18\%$ e [166-215]: $N_{CC}=2\%$, $N_{CG}=8\%$, $N_{GG}=0\%$); **B.** SNP rs11264359 ([15-65]: $N_{AA}=15\%$, $N_{AG}=18\%$, $N_{GG}=28\%$; [66-115]: $N_{AA}=61\%$, $N_{AG}=56\%$, $N_{GG}=44\%$; [116-165]: $N_{AA}=22\%$, $N_{AG}=18\%$, $N_{GG}=28\%$ e [166-215]: $N_{AA}=2\%$, $N_{AG}=10\%$, $N_{GG}=0\%$); **C.** SNP rs4620533 ([15-65]: $N_{CC}=15\%$, $N_{CG}=20\%$, $N_{GG}=36\%$; [66-115]: $N_{CC}=60\%$, $N_{CG}=55\%$, $N_{GG}=43\%$; [116-165]: $N_{CC}=23\%$, $N_{CG}=18\%$, $N_{GG}=21\%$ e [166-215]: $N_{CC}=2\%$, $N_{CG}=7\%$, $N_{GG}=0\%$); **D.** SNP rs4971072 ([15-65]: $N_{AA}=10\%$, $N_{AG}=20\%$, $N_{GG}=33\%$; [66-115]: $N_{AA}=72\%$, $N_{AG}=49\%$, $N_{GG}=44\%$; [116-165]: $N_{AA}=18\%$, $N_{AG}=23\%$, $N_{GG}=20\%$ e [166-215]: $N_{AA}=8\%$, $N_{AG}=3\%$, $N_{GG}=0\%$).

Utilizamos a mesma estratégia de análise para os parâmetros seguintes. De início, realizamos uma análise exploratória através da avaliação geral dos níveis de ferritina, proteína armazenadora de ferro, estratificados por genótipo. Para esse parâmetro, também não foi possível identificar diferenças significativas entre os genótipos (Figura 5.7). Porém, verifica-

se de forma clara uma tendência de aumento de ferritina na presença do alelo G, principalmente para o genótipo GG, em todos os SNPs avaliados. Para os SNPs rs11264359 e rs4971072, há maior número de indivíduos GG alto produtores de ferritina. Além disso, na distribuição geral de ferritina (dado não mostrado), observou-se que os indivíduos que apresentam os valores de ferritina acima da normalidade (>336 ng/mL) são homozigotos GG para todos os SNPs, ou seja, apresentam o haplótipo G/G/G/G.

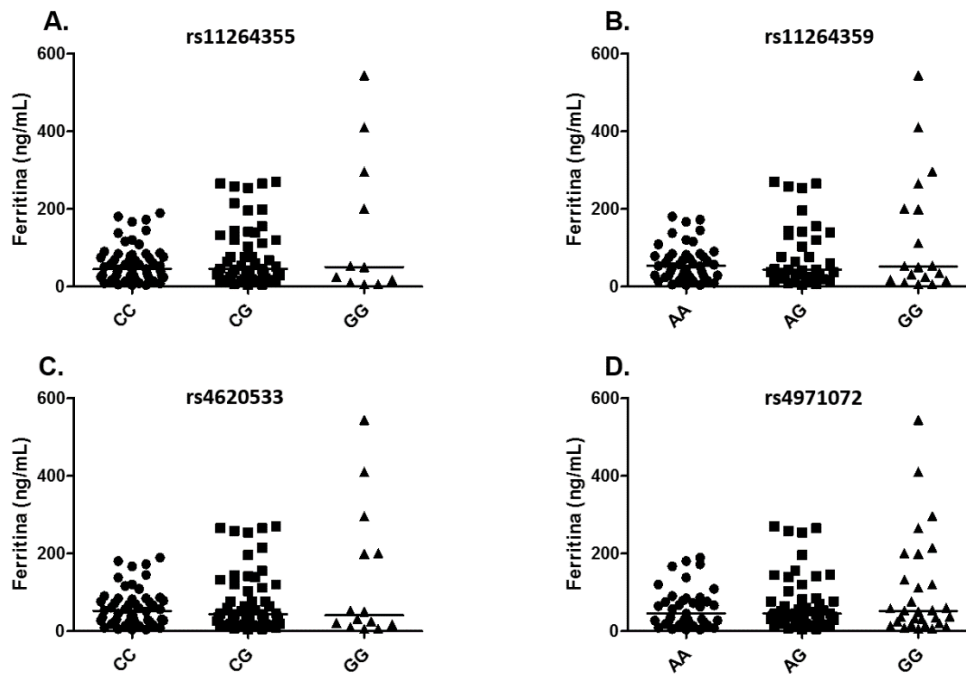


Figura 5.7 - Distribuição dos níveis de ferritina (ng/mL) em função dos genótipos dos SNPs. As barras horizontais representam a mediana. **A.** SNP rs11264355 (N_{CC}=56, N_{CG} =53, N_{GG}=11). **B.** SNP rs11264359 (N_{AA}=45, N_{AG} =35, N_{GG}=18). **C.** SNP rs4620533 (N_{CC}=52, N_{CG} =55, N_{GG}=14). **D.** SNP rs4971072 (N_{AA}=39, N_{AG} =51, N_{GG}=30).

Posteriormente, o resultado a partir da estratificação em categorias sugere uma relação entre o alelo G e as maiores concentrações de ferritina (ng/mL) (Figura 5.8). Observa-se que para os maiores intervalos de ferritina, 201-300 e >300-500, não é visto indivíduos carreadores dos genótipos majoritários (AA e CC) para os quatro SNPs analisados. O último intervalo 300-500, que representa produção de ferritina acima do normal (homens>336 ng/mL e mulheres>307 ng/mL), é composto por somente indivíduos GG. Nesta análise de frequências não observamos significância, porém quando estratificamos os dados para análise de carreador verificamos associação significativa para o SNP rs11264355, como descrito a seguir.

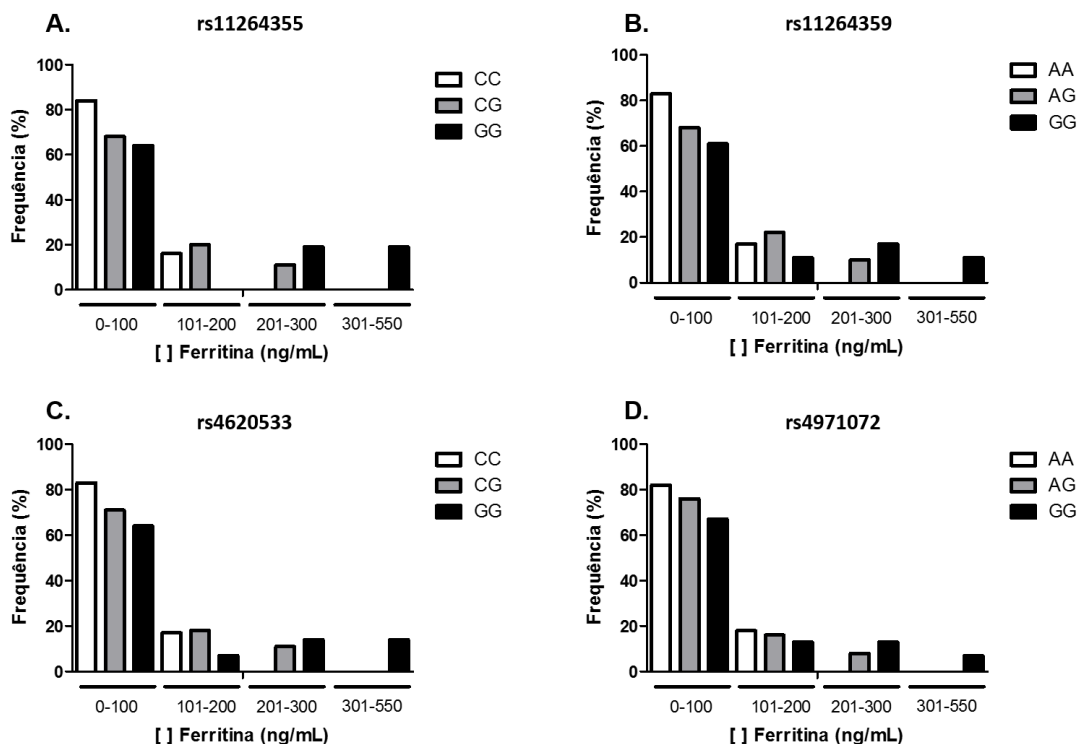


Figura 5.8 - Frequência dos níveis de ferritina (ng/mL) por intervalo em função dos genótipos. As barras horizontais representam as frequências (%). **A.** SNP rs11264355 ([0-100]: $N_{CC}=84\%$, $N_{CG}=68\%$, $N_{GG}=64\%$; [101-200]: $N_{CC}=16\%$, $N_{CG}=20\%$, $N_{GG}=0\%$; [201-300]: $N_{CC}=0\%$, $N_{CG}=11\%$, $N_{GG}=19\%$ e [301-550]: $N_{CC}=0\%$, $N_{CG}=0\%$, $N_{GG}=19\%$). **B.** SNP rs11264359 ([0-100]: $N_{AA}=83\%$, $N_{AG}=68\%$, $N_{AA}=61\%$; [101-200]: $N_{AA}=17\%$, $N_{AG}=22\%$, $N_{AA}=11\%$; [201-300]: $N_{AA}=0\%$, $N_{AG}=10\%$, $N_{GG}=17\%$ e [301-550]: $N_{AA}=0\%$, $N_{AG}=0\%$, $N_{GG}=11\%$). **C.** SNP rs4620533 ([0-100]: $N_{CC}=83\%$, $N_{CG}=71\%$, $N_{GG}=64\%$; [101-200]: $N_{CC}=17\%$, $N_{CG}=18\%$, $N_{GG}=7\%$; [201-300]: $N_{CC}=0\%$, $N_{CG}=11\%$, $N_{GG}=14\%$ e [301-550]: $N_{CC}=0\%$, $N_{CG}=0\%$, $N_{GG}=14\%$). **D.** SNP rs4971072 ([0-100]: $N_{AA}=82\%$, $N_{AG}=76\%$, $N_{AA}=67\%$; [101-200]: $N_{AA}=18\%$, $N_{AG}=16\%$, $N_{AA}=13\%$; [201-300]: $N_{AA}=0\%$, $N_{AG}=8\%$, $N_{GG}=13\%$ e [301-550]: $N_{AA}=0\%$, $N_{AG}=0\%$, $N_{GG}=7\%$).

Com base nos dados acima, foi feito um teste qui-quadrado a partir da análise dos carreadores do alelo G e genótipos majoritários entre duas categorias de concentração: menores produtores – [0-100] e alto produtores – [101-200, 201-300 e >300-500] para todos os SNPs avaliados (Figura 5.9). Como resultado, foi visto que a distribuição dos níveis de ferritina apresentam associação com o alelo G para o SNP rs11264355 ($p=0,034$), mas não para os outros SNPs.

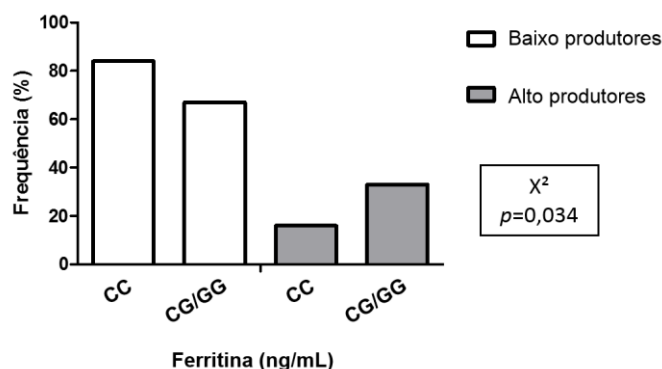


Figura 5.9 – Frequência de produtores de ferritina (ng/mL) em função dos genótipos majoritários e carreadores de G para o SNP rs11264355. As barras horizontais representam o número de indivíduos por categoria. χ^2 =qui-quadrado ($p<0,05$). Os grupos comparados no χ^2 foram: n° de indivíduos baixo produtores de ferritina (0-100) e n° de indivíduos alto produtores de ferritina (101-550), estratificados por genótipo majoritário e carreadores. As barras horizontais representam as frequências (%). **A.** SNP rs11264355 ([0-100]: $N_{CC}=84\%$, $N_{CG/GG}=67\%$; [101-200]: $N_{CC}=16\%$, $N_{CG/GG}=17\%$; [201-300]: $N_{CC}=0\%$, $N_{CG/GG}=13\%$ e [301-550]: $N_{CC}=0\%$, $N_{CG/GG}=3\%$). **B.** SNP rs11264359 ([0-100]: $N_{AA}=83\%$, $N_{AG/GG}=66\%$; [101-200]: $N_{AA}=17\%$, $N_{AG/GG}=19\%$; [201-300]: $N_{AA}=0\%$, $N_{AG/GG}=12\%$ e [301-550]: $N_{AA}=0\%$, $N_{AG/GG}=13\%$). **C.** SNP rs4620533 ([0-100]: $N_{CC}=83\%$, $N_{CG/GG}=69\%$; [101-200]: $N_{CC}=17\%$, $N_{CG/GG}=16\%$; [201-300]: $N_{CC}=0\%$, $N_{CG/GG}=12\%$ e [301-550]: $N_{CC}=0\%$, $N_{CG/GG}=13\%$). **D.** SNP rs4971072 ([0-100]: $N_{AA}=82\%$, $N_{AG/GG}=72\%$; [101-200]: $N_{AA}=18\%$, $N_{AG/GG}=15\%$; [201-300]: $N_{AA}=0\%$, $N_{AG/GG}=10\%$ e [301-550]: $N_{AA}=0\%$, $N_{AG/GG}=3\%$).

Em seguida, a análise da capacidade total de ligação do ferro à transferrina (mcg/dL), ou TIBC, não mostrou diferença entre os genótipos dos SNPs estudados (Figura 5.10). O TIBC é uma medida indireta da transferrina circulante, e em situação de sobrecarga de ferro, espera-se que estes valores estejam diminuídos ou normais (Grotto et al., 2011).

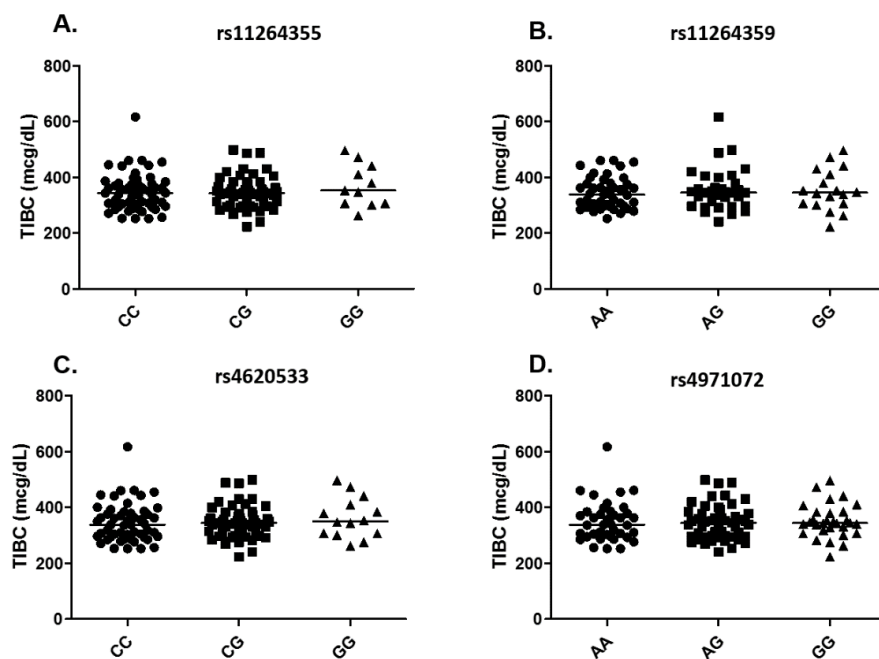


Figura 5.10 - Distribuição da capacidade de total de ligação do ferro à transferrina (mcg/dL) em função dos genótipos. As barras horizontais representam a mediana. **A.** SNP rs11264355 ($N_{CC}=56$, $N_{CG}=53$, $N_{GG}=11$). **B.** SNP rs11264359 ($N_{AA}=45$, $N_{AG}=35$, $N_{GG}=18$). **C.** SNP rs4620533 ($N_{CC}=52$, $N_{CG}=55$, $N_{GG}=14$). **D.** SNP rs4971072 ($N_{AA}=39$, $N_{AG}=51$, $N_{GG}=30$).

O índice de saturação da transferrina (ST) é calculado pela concentração de Ferro plasmático pelo TIBC. Os valores normais deste parâmetro encontram-se entre 16 a 55%. Acima disso, há indicativo de sobrecarga de ferro (Grotto et al., 2011). Na Figura 5.11, observamos que apesar de não haver diferenças significativas entre os genótipos para os quatro SNPs estudados, no grupo de genótipos AG e GG para os “tag SNPs” rs11264359 e rs4971072 existem indivíduos que apresentam índices mais altos de saturação de transferrina. Nessa condição, quanto maior a saturação da transferrina, maior será a reserva de ferro.

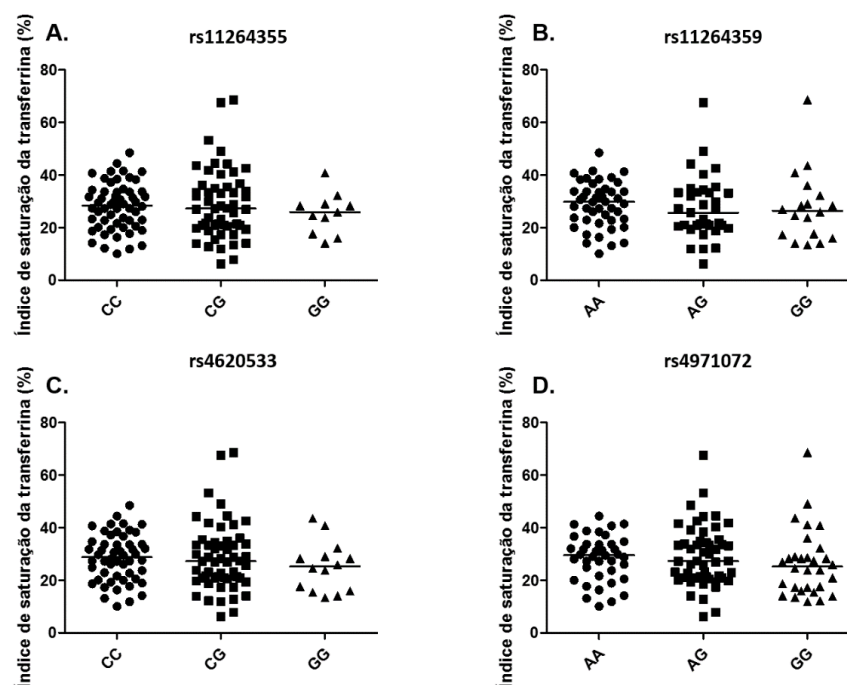


Figura 5.11 – Distribuição do índice de saturação da transferrina (%) em função dos genótipos dos SNPs estudados. As barras horizontais representam a medianas. **A.** SNP rs11264355 ($N_{CC}=56$, $N_{CG}=53$, $N_{GG}=11$). **B.** SNP rs11264359 ($N_{AA}=45$, $N_{AG}=35$, $N_{GG}=18$). **C.** SNP rs4620533 ($N_{CC}=52$, $N_{CG}=55$, $N_{GG}=14$). **D.** SNP rs4971072 ($N_{AA}=39$, $N_{AG}=51$, $N_{GG}=30$).

5.3.2 – Caracterização dos níveis de haptoglobina em indivíduos saudáveis e pacientes

A produção de haptoglobina foi quantificada no soro dos 122 indivíduos saudáveis e também em 67 pacientes, possibilitando a comparação da produção dessa proteína em ambos os grupos em função dos genótipos dos SNPs avaliados. Inicialmente, seguindo a linha de comparação dos parâmetros sanguíneos em indivíduos saudáveis, estratificamos os indivíduos por genótipos e avaliamos a produção de haptoglobina (Figura 5.12). Como consequência, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas que indicassem associação entre o genótipo e a produção de haptoglobina para os SNPs rs11264355, rs11264359, rs4620533 e rs4971072. No entanto, é visto que alguns indivíduos que apresentam os maiores valores de haptoglobina correspondem no grupo de genótipos GG.

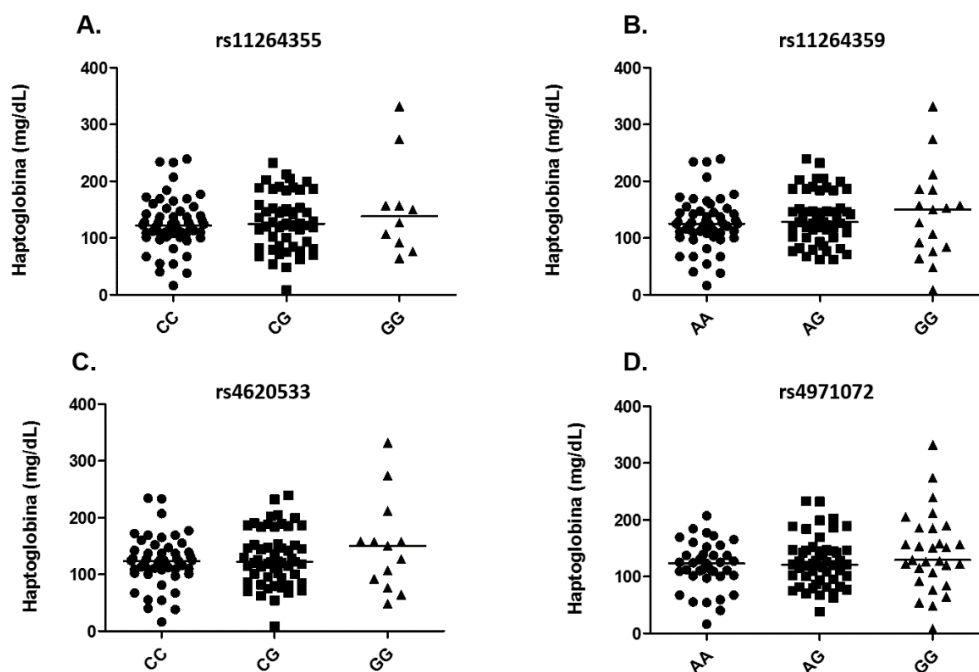


Figura 5.12 - Distribuição dos níveis de haptoglobina (mg/dL) em função dos genótipos em indivíduos saudáveis. As barras horizontais representam a mediana, comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). **A.** SNP rs11264355 ($N_{CC}=54$, $N_{CG}=53$, $N_{GG}=10$). **B.** SNP rs11264359 ($N_{AA}=43$, $N_{AG}=35$, $N_{GG}=17$). **C.** SNP rs4620533 ($N_{CC}=50$, $N_{CG}=55$, $N_{GG}=13$). **D.** SNP rs4971072 ($N_{AA}=37$, $N_{AG}=51$, $N_{GG}=29$).

Em seguida, no gráfico de frequências representado na Figura 5.13, a presença de indivíduos GG nos intervalos de maiores valores de haptoglobina pode ser melhor visualizada. Este gráfico mostra a distribuição das frequências por genótipo em três intervalos de concentração em indivíduos saudáveis. Consideramos que os indivíduos que apresentam haptoglobina >200 mg/dL são alto produtores dessa proteína, pois os valores excedem a referência padrão utilizada pelo Laboratório Sérgio Franco. Nota-se que neste intervalo há uma maior frequência de indivíduos GG para todos os SNPs analisados.

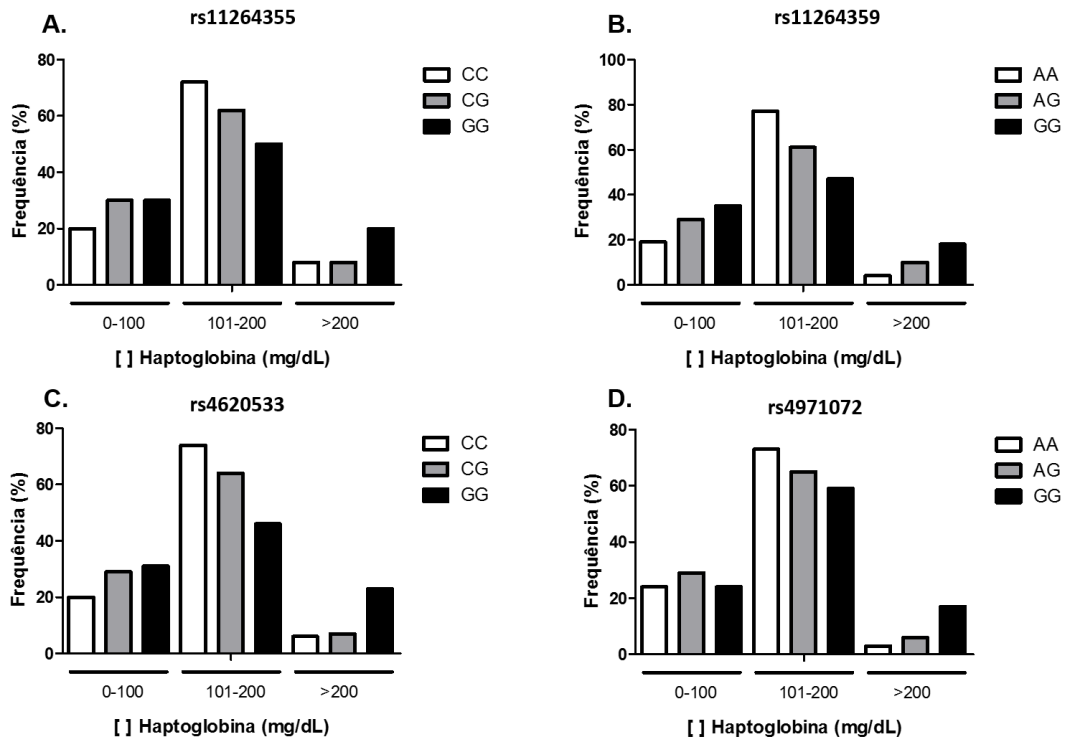


Figura 5.13 - Frequência dos níveis de haptoglobina (mg/dL) em indivíduos saudáveis por intervalo em função dos genótipos. As barras horizontais representam as frequências (%). **A.** SNP rs11264355 ([0-100]: $N_{CC}=20\%$, $N_{CG}=30\%$, $N_{GG}=30\%$; [101-200]: $N_{CC}=72\%$, $N_{CG}=62\%$, $N_{GG}=50\%$; [201-300]: $N_{CC}=8\%$, $N_{CG}=8\%$, $N_{GG}=20\%$). **B.** SNP rs11264359 ([0-100]: $N_{AA}=19\%$, $N_{AG}=29\%$, $N_{AA}=35\%$; [101-200]: $N_{AA}=77\%$, $N_{AG}=61\%$, $N_{AA}=47\%$; [201-300]: $N_{AA}=4\%$, $N_{AG}=10\%$, $N_{GG}=18\%$). **C.** SNP rs4620533 ([0-100]: $N_{CC}=20\%$, $N_{CG}=29\%$, $N_{GG}=31\%$; [101-200]: $N_{CC}=74\%$, $N_{CG}=64\%$, $N_{GG}=46\%$; [201-300]: $N_{CC}=6\%$, $N_{CG}=7\%$, $N_{GG}=23\%$). **D.** SNP rs4971072 ([0-100]: $N_{AA}=24\%$, $N_{AG}=29\%$, $N_{AA}=24\%$; [101-200]: $N_{AA}=73\%$, $N_{AG}=65\%$, $N_{AA}=59\%$; [201-300]: $N_{AA}=3\%$, $N_{AG}=6$, $N_{GG}=17\%$).

Após essas análises, o próximo passo foi constatar se a diferença observada entre os genótipos em indivíduos saudáveis ocorria também em pacientes. Para isso, o primeiro passo foi comparar a mediana total das concentrações de haptoglobina em casos e controles (Figura 5.14). O resultado mostrou que em casos a produção total de haptoglobina é maior quando comparada aos controles. Esse resultado sugere a existência de uma regulação diferenciada de haptoglobina em indivíduos portadores de infecções.

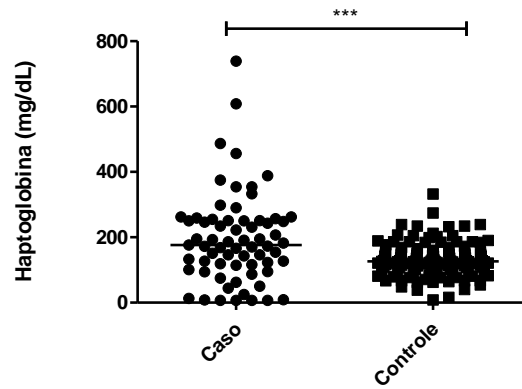


Figura 5.14 – Comparação entre os níveis totais de haptoglobina entre casos e controles. As barras horizontais representam a mediana. N(casos)=67 e N(controles)=122. *** $p=0,0002$.

Após essa análise, o próximo passo foi constatar se a estratificação por genótipos também sugeria uma elevação nos níveis de haptoglobina nos indivíduos que carregam o genótipo GG no grupo de pacientes. Sendo assim, a primeira análise em pacientes foi baseada na comparação dos níveis de haptoglobina de acordo com os genótipos (Figura 5.15). Observamos diferenças estatisticamente significativas entre a produção de haptoglobina entre os genótipos heterozigotos e GG para os SNPs rs11264359, rs4620533 e rs4971072.

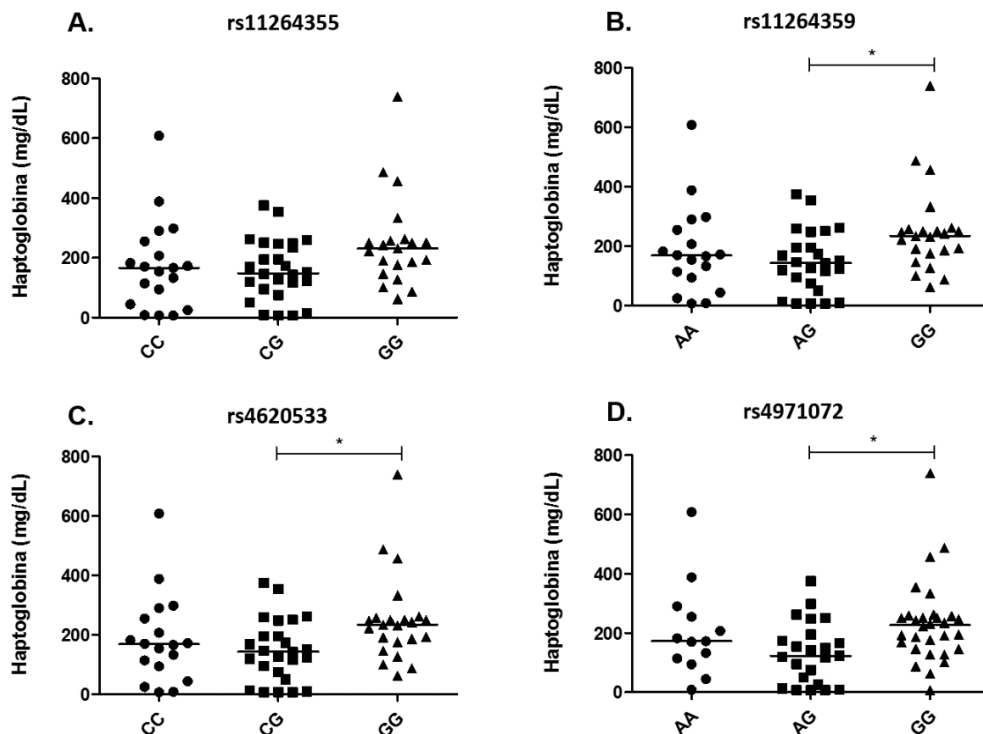


Figura 5.15 - Distribuição dos níveis de haptoglobina (mg/dL) em função dos genótipos em pacientes. As barras horizontais representam a mediana. **A.** SNP rs11264355 ($N_{CC}=19$, $N_{CG}=26$, $N_{GG}=21$). **B.** SNP rs11264359

($N_{AA}=18$, $N_{AG}=25$, $N_{GG}=23$). **C.** SNP rs4620533 ($N_{CC}=18$, $N_{CG}=25$, $N_{GG}=23$). **D.** SNP rs4971072 ($N_{AA}=13$, $N_{AG}=23$, $N_{GG}=30$).

A partir daí, aprofundamos a investigação através da separação dos pacientes entre carreadores do alelo majoritário e GG para todos os SNPs (Tabela 5.19). Com isso, observamos que a presença de dose alélica (GG) para todos os SNPs conduziu significativamente a diferença na produção de haptoglobina entre os pacientes de hanseníase. Ou seja, o efeito foi verificado em homozigotos GG, mas não em heterozigotos. Esse resultado foi visto de forma significativa em pacientes, porém não foi observado em indivíduos saudáveis.

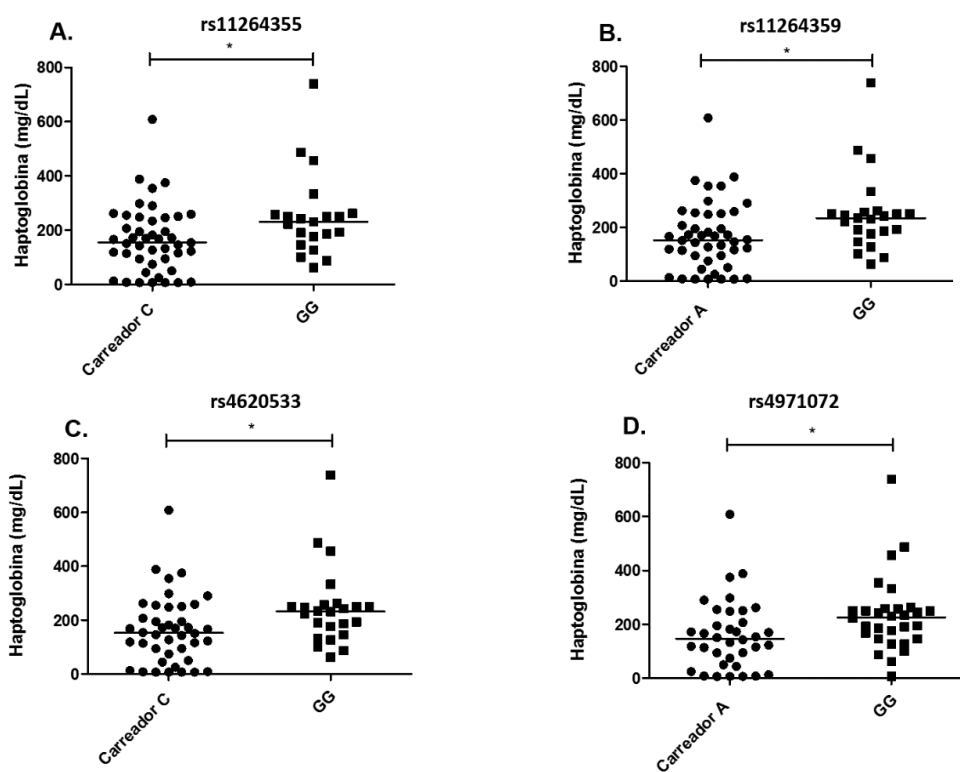


Figura 5.16 - Comparação entre os níveis de haptoglobina em pacientes carreadores do alelo majoritário e homozigotos GG. As barras verticais representam a mediana (* $p<0,05$). O grupo de carreadores compreende indivíduos homozigotos majoritários e heterozigotos para os SNPs. **(A)** rs11264355, **(B)** rs11264359, **(C)** rs4620533 e **(D)** rs4971072.

Em seguida, foi realizada a comparação baseada na combinação dos “tag SNPs”, selecionando os indivíduos que apresentassem a combinação rs11264359G/rs4971072G associada ao risco de desenvolvimento de hanseníase. Conforme observado na Figura 5.17, tanto na estratificação por combinação de genótipos (A) quanto para a estratificação em

carreadores (B) foi possível observar aumento significativo entre os indivíduos que carregam os alelos rs11264359G/rs4971072G.

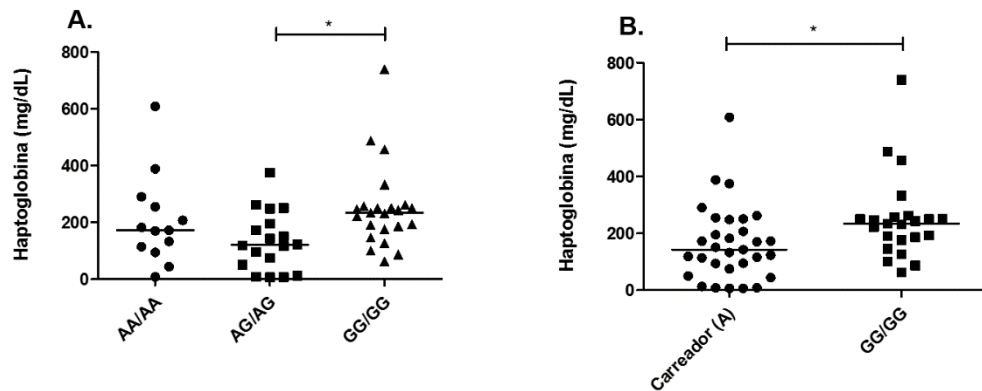


Figura 5.17 – Comparação entre os níveis de haptoglobina pela combinação dos SNPs rs11264359/rs4971072 em pacientes. As barras verticais representam a mediana ($N_{AA/AA}=13$, $N_{AG/AG}=18$, $N_{GG/GG}=21$). **A. Comparação entre os genótipos combinados rs11264359/rs4971072; B. Comparação entre carreadores do alelo A e homocigotos GG.** As barras verticais representam a mediana ($p<0,05^*$). O grupo de carreadores compreende indivíduos AA e AG para os SNPs rs11264359 e rs4971072.

Por fim, na tentativa de facilitar a visualização do aumento da haptoglobina conforme a presença de homocigose GG para a combinação de genótipos referente aos SNPs rs11264359/rs4971072, a próxima análise avaliou a frequência da haptoglobina em intervalos estratificado pela combinação genotípica em pacientes. A Figura 5.18 demonstrou que a maior frequência de indivíduos que apresentam a combinação rs11264359GG/rs4971072GG está contida no intervalo 201-300 (mg/dL). O intervalo >300 (mg/dL) apresenta uma frequência considerável de homocigotos GG, enquanto a menor frequência destes indivíduos estão no intervalo 0-100(mg/dL). Com isso, sugerimos uma possível relação entre o genótipo GG e os maiores níveis de haptoglobina em pacientes.

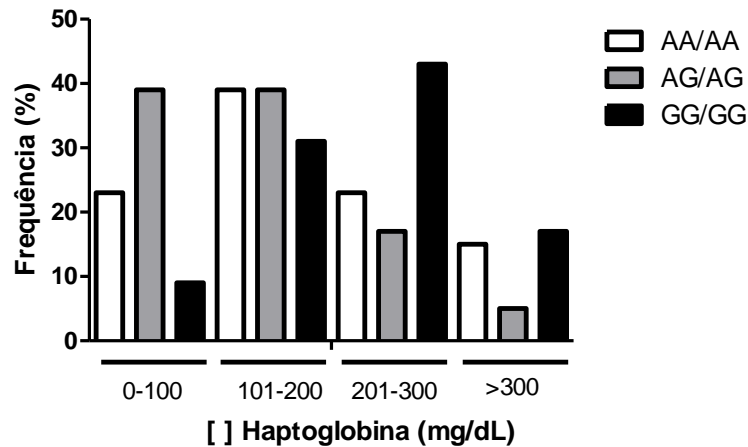


Figura 5.18 – Frequência dos níveis de haptoglobina (mg/dL) por intervalo de concentração em função da combinação de genótipos referentes aos SNPs rs11264359/rs4971072. As barras horizontais representam as frequências (%). ([0-100]: $N_{AA/AA}=23\%$, $N_{AG/AG}=39\%$, $N_{GG/GG}=9\%$; [101-200]: $N_{AA/AA}=39\%$, $N_{AG/AG}=39\%$, $N_{GG/GG}=31\%$; [201-300]: $N_{AA/AA}=23\%$, $N_{AG/AG}=17\%$, $N_{GG/GG}=43\%$ e [>300]: $N_{AA/AA}=15\%$, $N_{AG/AG}=5\%$, $N_{GG/GG}=17\%$).

5.3.3 - Análise da atividade da piruvato quinase (PK)

Na tentativa de desvendar se a associação de risco do alelo G estaria influenciando a funcionalidade da enzima piruvato kinase, a atividade da enzima foi quantificada em indivíduos saudáveis e comparada em função dos genótipos dos SNPs do estudo. A comparação seguiu os princípios anteriores: os indivíduos foram estratificados por genótipo, considerando o genótipo proveniente da combinação de genótipos referentes aos “tag SNPs” rs11264359/rs4971072, e a mediana da atividade da enzima foi comparada entre os grupos. Como resultado, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas que indicassem associação entre a atividade da PK e os SNPs avaliados neste estudo em hemácias ou em PBMC (Figura 5.19).

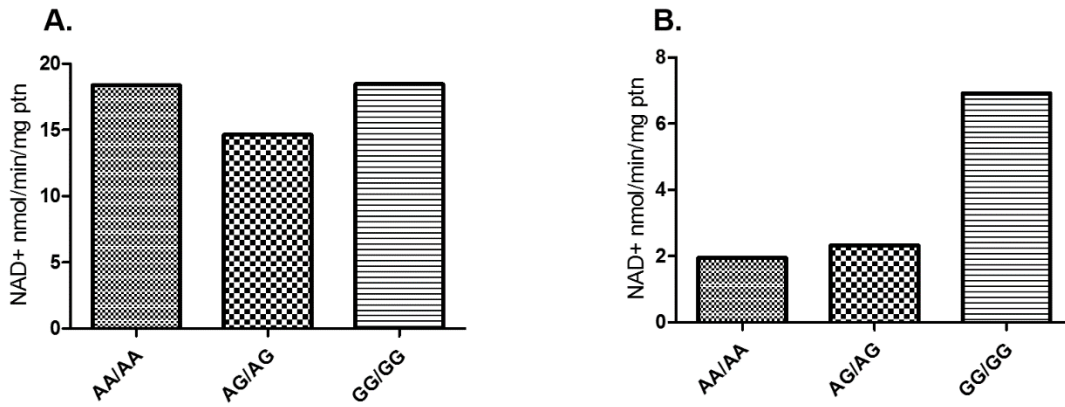


Figura 5.19 - Atividade enzimática da PK em função da combinação de SNPs rs11264359/rs4971072. A análise da atividade da PK foi quantificada em hemácias (**A**) e células mononucleares (**B**) através da oxidação de NADH, monitorada em 340 nm e normalizada pelo número de proteínas (mg). Os grupos amostrais são: NAA/AA = 10, NAG/AG = 10, NGG/GG = 7. A leitura foi realizada em triplicatas. O resultado foi representado pela mediana.

6. DISCUSSÃO

De modo geral, as doenças infecciosas apresentam características intrigantes, pois o desfecho não depende somente da presença do patógeno, mas também da variabilidade entre os indivíduos. A teoria da influência genética no desenvolvimento de doenças infecciosas é muito bem postulada, e diversos trabalhos já demonstraram o envolvimento dos genes do hospedeiro na suscetibilidade a infecções. Neste contexto, o grupo de pesquisadores Laurent Abel, Jean-Laurent Casanova e Erwin Schurr tem contribuído decisivamente para a construção de algumas hipóteses como a de “um gene, múltiplas infecções” relacionado às doenças infecciosas humanas. Essa premissa defende a existência de desordens Mendelianas (imunodeficiências raras) provocadas por um gene que levam a suscetibilidade a patógenos intracelulares avirulentos, por exemplo (Casanova & Abel, 2002). Normalmente, essas desordens apresentam mutações raras em genes que compõem o eixo IL-12/IFN γ . Partindo desta ideia, considera-se que indivíduos saudáveis possam carregar variações genéticas que alteram sutilmente o fenótipo desencadeado pelo gene em questão, favorecendo o desenvolvimento de doenças infecciosas comuns como a hanseníase. Neste caso, assumindo que são doenças complexas o desfecho é provocado por uma combinação de fatores genéticos e ambientais. Por outro lado, as doenças infecciosas comuns estão relacionadas com a herança de numerosos genes de suscetibilidade. A literatura mais recente defende a existência de genes principais que controlam a suscetibilidade às doenças infecciosas, denominados de “major genes”. Diversos genes e regiões cromossômicas já foram associadas a doenças infecciosas, porém, nos últimos anos têm-se tentado desvendar quais são, de fato, os principais genes que regulam a suscetibilidade e resistência a infecções (Casanova & Abel, 2007; Alcais et al., 2009).

Neste trabalho, partimos da premissa de que mutações raras no gene *PKLR* estão associados à anemia hemolítica crônica não esferocítica, e indivíduos que carregam essas mutações apresentam resistência à infecção por *Plasmodium sp.* A partir daí, construímos a hipótese baseada na ideia de que polimorfismos frequentes no *PKLR* que não conferem anemia, mas que alteram sutilmente a função da enzima, estariam associados com a resistência à malária a nível populacional. A literatura demonstra evidências claras de pressão seletiva positiva exercida sobre esse gene pela malária em regiões hiperendêmicas (Berghout et al., 2012). Neste estudo, sugerimos também que esses SNPs estariam associados também a suscetibilidade à patógenos intracelulares. A hipótese original foi claramente demonstrada em modelos experimentais (van Wijk et al., 2005; Ayi et al., 2008 & Roy et al., 2007), em que camundongos selecionados para resistência a malária apresentaram também maior suscetibilidade à *Salmonella typhimurium*, um patógeno intracelular.

A hipótese deste manuscrito foi confirmada, inicialmente, a partir de dois estudos caso-controle que sugeriram que SNPs do *PKLR* estão associados a suscetibilidade à hanseníase na população Brasileira e a proteção à tuberculose na população Moçambicana. Em seguida, foi verificado que estes SNPs (rs11264355, rs11264359, rs4620533 e rs4971072) resultam em um efeito biológico sutil, gerando um leve aumento dos níveis de ferritina e haptoglobina em indivíduos carreadores das variantes de risco. Esse fato foi correlacionado com o aumento da sobrevivência do bacilo, uma vez que patógenos intracelulares obrigatórios dependem do metabolismo de ferro do seu hospedeiro para sua sobrevivência, postulamos que o acúmulo de ferritina nas células seria vantajoso para o desenvolvimento destes agentes (de Voss et al., 1999).

A análise de polimorfismos no gene *PKLR* surgiu a partir de trabalhos que estudaram a associação desse gene com a resistência e suscetibilidade a outras doenças infecciosas (Alves et al., 2010; Ayi et al., 2009; Roy et al., 2007). Já no nosso laboratório, estudos prévios de microarranjo identificaram novos genes candidatos bem como novas vias envolvidas com a patogênese da hanseníase. Dentre as vias principais identificadas, destacam-se vias de IFN tipo-I e de metabolismo basal da glicólise e cadeia respiratória (Guerreiro et al., 2013; Robottom-Ferreira, 2011; Pinto, 2013). Portanto, o desdobramento inicial do projeto consistiu na confirmação genética destes estudos funcionais através da análise de genes destas vias. Somando-se a isso, até 2010 a hipótese de que a deficiência da PK estava relacionada à resistência a malária em humanos ainda precisava ser testada. Até aquele momento, a deficiência da PK apresentou efeito protetor contra a malária em estudos *in vitro* e em modelos experimentais com infecção em camundongos (Min-oO et al., 2003; Ayi et al., 2008; Durand & Coetzer, 2008). Posteriormente, o trabalho de Machado e colaboradores realizou um rastreamento na região do *PKLR* e gerou uma lista de polimorfismos candidatos a serem estudados (Machado et al., 2010). A partir de então, a associação do *PKLR* com proteção à tuberculose na população de Moçambique e com a suscetibilidade à hanseníase na população Brasileira foi demonstrada recentemente em trabalhos do nosso laboratório (Mabunda, 2013; Lima-Bezerra, 2013).

No presente trabalho, a associação do *PKLR* como marcador de suscetibilidade a hanseníase foi consistentemente demonstrada pela associação de quatro SNPs rs11264355, rs11254359, rs4620533 e rs4971072 em regiões adjacentes e intrônicas do gene. Estes SNPs estão em desequilíbrio de ligação moderado entre eles e o fato de eles não formarem blocos em LD demonstra que provavelmente cada um deles tem um papel relevante, não sendo possível retirar conclusões de qual é o SNP causal da suscetibilidade. Porém, quando o

haplótipo foi analisado, sugerimos que a combinação que contém os alelos rs11264359G/rs4971072G está protagonizando a associação de risco verificada entre os SNPs. Isso porque, além da associação individual desses SNPs ter gerado valores de OR significativos, os haplótipos mais frequentes na população e que também estão associadas ao risco contém o alelo G referente aos SNPs rs11264359 e rs4971072. Sendo assim, sugerimos que estes SNPs são “tag SNPs” para o estudo de associação do *PKLR* com a hanseníase na população Brasileira estudada. Considerando o desequilíbrio de ligação entre estes SNPs ($r^2=55$) na população do Rio de Janeiro, aceitamos que a segregação conjunta destes alelos ocorre em 55% das vezes e a sua presença em indivíduos sadios fortalece a associação de risco de desenvolvimento da hanseníase.

Os estudos em genética de populações vêm apontando para a teoria de "variantes comuns - doenças comuns", trabalhando a ideia da relevância de variantes com alta frequência nas populações, como os SNPs, para o desfecho de doenças infecciosas. Sugere-se que esses marcadores apresentam um efeito modesto individualmente, mas podem exercer um efeito maior quando em conjunto. Portanto, resolvemos expandir a busca de SNPs na região do *PKLR* através do sequenciamento do éxon 11. Essa estratégia permitiu também melhor entender o perfil de LD na região do *PKLR* na população do Rio de Janeiro e também identificar novas variantes que possam explicar a associação. Como resultado, identificamos quatro SNPs nessa região que já estão descritos na literatura e que, três deles fazem parte da lista inicial de SNPs a serem estudados neste manuscrito (rs8847, rs932972, rs1052176 e rs1052177). Os mapas de LD entre as populações de sequenciamento mostrou que a população Brasileira, como o esperado, apresentou uma maior variabilidade de SNPs em desequilíbrio de ligação.

A ideia de se testar o desequilíbrio de ligação entre os SNPs foi a de identificar variantes comuns que possam estar em desequilíbrio de ligação com variantes de maior efeito genético e funcional, que resultam na associação observada (Gibson et al., 2013). O desequilíbrio de ligação da população do Rio de Janeiro reunindo os dados do sequenciamento e do PCR em Tempo Real, representados na Figura 9.3 (Anexo1), mostrou que existe um bloco bem definido formado pelos SNPs rs932972, rs1052176, rs1052177, rs4620533 e rs11264355, este último estando com forte LD com o SNP rs11264359 e LD moderado com rs4971072. A partir desses dados é possível identificar que o SNP rs8847 é candidato para o próximo estudo de associação, e como está localizado em uma região 3'-UTR, ocasionalmente pode ser um SNP que esteja funcionalmente relacionado com o desfecho na hanseníase. Por fim, a análise dos SNPs rs8177970 e rs8177963 não detectou

associação pelo fato de apresentarem uma frequência muito baixa na população e, por isso, são pouco informativos.

Retornando ao estudo de associação, deve-se considerar que a população Brasileira tem descendência miscigenada com predominância Africana e Europeia, e devido às diferenças culturais próprias de colonização, é possível que estudos genéticos realizados com diferentes populações Brasileiras geograficamente distintas apresentem resultados controversos (Lins et al., 2010; Marchini et al., 2004). Assim, para se evitar associações espúrias, é necessário a avaliação da contribuição das etnias entre os indivíduos que compõem as populações de estudo (Manta et al., 2013). Nesse caso, as associações genéticas geradas no presente trabalho foram corrigidas pelas co-variáveis sexo e etnia. Entretanto, um trabalho desenvolvido no nosso grupo de pesquisa tem o objetivo de definir a ancestralidade dos nossos bancos genéticos a fim de auxiliar nos ajustes dos testes de associação (trabalho em andamento).

Além disso, conforme descrito anteriormente, há uma forte pressão seletiva por patógenos sendo exercida sobre a região do *PKLR*. A hipótese da malária como potente força evolutiva que modifica as frequências de polimorfismos associados às doenças mendelianas, como a anemia falciforme, talassemias e a deficiência de enzimas glicolíticas já é muito bem descrita na literatura (Kwiatkowski, 2005). Sugere-se que o aumento da frequência de mutações que provocam anemias hemolíticas na África seja uma estratégia evolutiva para proteger os indivíduos contra o *Plasmodium sp.* (Jacobash et al., 1996). A malária é uma doença que provoca milhões de mortes anualmente no continente Africano, afetando principalmente as crianças. Sendo assim, indivíduos que apresentam variações que favorecem marginalmente a resistência a malária, mas que não apresentam necessariamente os sintomas clínicos de anemia, são selecionados positivamente (Ayi et al., 2009). Estudos demonstraram que a região do *PKLR* é altamente conservada para manter a proteção contra a malária (Alves et al., 2010). Portanto, sabendo que herança Africana é relevante na miscigenação da população Brasileira, é muito provável que essas regiões conservadas tenham sido transmitidas para a nossa população.

Por outro lado, a pressão seletiva por patógenos também caminha em direção a suscetibilidade a patógenos intracelulares, como o visto para *Salmonella sp.* (Roy et al., 2007; Min-Oo et al., 2003). Essa hipótese foi elaborada em modelos murinos e pode expressar o que ocorre no fenótipo de deficiência da PK em humanos, já que os animais sofrem de anemia hemolítica e apresentam reticulocitose, característica marcante em pacientes PK deficientes (Min-Oo et al., 2004). É importante ressaltar que não somente o *PKLR*, mas mutações em

outros genes, como o *G6PD* e genes de alfa talassemias também são exemplos de genes que estão sofrendo a seleção pela malária (Purohit et al., 2014; Hedrick, 2012).

Ainda, sugerimos que a pressão seletiva sobre o *PKLR* foi observada na comparação entre a população do Rio de Janeiro e de Moçambique. Já foi visto na literatura que os polimorfismos nesse gene aparecem com frequências significativamente alteradas entre a população Africana e a população Europeia (Alves et al., 2010). Esse fato se repete nas populações testadas neste trabalho, em que observamos que as frequências alélicas se invertem entre as populações, ou seja, alelos que são majoritários em Brasileiros apresentam-se como minoritários em Moçambicanos. Isso pode ser explicado quando observamos o SNP rs4971072, por exemplo, sugerindo que o alelo G desse SNP é marcador de resistência à malária em Africanos, e então a sua frequência deve estar se mantendo seletivamente aumentada nesta população. Já em Brasileiros, devido a contribuição de miscigenação com a participação relevante da população Europeia, o alelo G independentemente de ser um alelo de risco ao desenvolvimento de doenças infecciosas, tem a frequência diminuída no Rio de Janeiro. Isso nos leva a propor que provavelmente o efeito observado no Rio de Janeiro é referente a um efeito local da ancestralidade Africana nesta população. De fato, dados não mostrados aqui sugerem que a tentativa de replicação do estudo caso-controle em uma população de outra cidade, Rondonópolis (Mato Grosso do Sul), não reproduz os achados, indicando que a contribuição Africana naquela população pode estar interferindo na detecção da replicação genética.

Tendo em vista a importância da validação funcional nos estudos de associação genética, a análise da correlação genótipo-fenótipo do presente trabalho foi baseada em conceitos fundamentados na literatura. Sabe-se que no ambiente do hospedeiro, a produção de sideróforos e métodos alternativos de captação de ferro em patógenos intracelulares, especialmente em micobactérias, já é muito bem descrito. Entretanto, pouco se sabe sobre a regulação do ferro na célula infectada e a importância desse elemento para a patogênese de doenças micobacterianas (Dussurget et al., 1998). Um dos motivos que provocam aumento de ferro em macrófagos, durante a inflamação por exemplo, é a ligação da hepcidina (hormônio regulador de ferro) ao receptor ferroportina, evitando a saída de ferro da célula (Nemeth et al., 2004). Outro mecanismo descrito na literatura e correlacionado à hipótese deste trabalho, detalhado posteriormente, é a ligação do complexo haptoglobina-hemoglobina ao receptor de macrófagos CD163 durante os eventos de hemólise (Kristiansen et al., 2001).

A hemólise intravascular é um evento fisiológico que pode ser tornar crônico em determinadas patologias, como na anemia falciforme ou anemia hemolítica. O metabolismo

de hemoglobinas em macrófagos também é uma função fisiológica principal em macrófagos de tecido para manter a homeostase do ferro no organismo (de Back et al., 2014). O efeito funcional sugerido neste trabalho relaciona-se ao aumento sutil da hemólise em hemácias prematuras devido à presença do haplótipo rs11264359G/rs4971072G no gene *PKLR*. Esses polimorfismos não provocam alterações em nível de desordem metabólica (como visto na anemia hemolítica clássica), mas aumentariam a suscetibilidade a patógenos intracelulares, como no caso da hanseníase.

A fim de encontrar a explicação biológica para a associação encontrada, o presente estudo incluiu a quantificação dos níveis de ferro, ferritina, capacidade total de ligação do ferro (TIBC), índice de saturação da transferrina (IST) e haptoglobina, que foram analisados conjuntamente com os genótipos dos indivíduos estudados. A escolha destes mediadores foi fundamentada em dados disponíveis na literatura e os indivíduos analisados não apresentaram histórico de doença crônica, alcoolismo ou doenças hepáticas. Além disso, a coleta de sangue foi realizada pela manhã, considerando que as concentrações de ferro no organismo sofrem variação circadiana. Os resultados gerados sugerem que a presença do alelo G em homozigose para o SNP rs11264355 foi significativamente associado ao aumento de ferritina. Apesar de os dados não resultarem em significância para os SNPs rs11264359, rs4620533 e rs4971072, observamos que a presença do alelo G para os quatro SNPs estudados manifestam uma tendência de aumento de ferritina, mas não de ferro sérico em indivíduos saudáveis. Contudo, visualizamos uma sutil diferença na distribuição de ferro para os SNPs rs11264359 e rs4971072 (possíveis “tag SNPs”) em relação ao ferro. A ausência de significância para o ferro sérico entre os genótipos era esperada, já que a forma livre desse elemento é altamente tóxica para a célula e, conseqüentemente, deve estar dentro de um limite de normalidade. Para evitar o estresse oxidativo, as proteínas plasmáticas, ferritina e transferrina, acoplam-se ao ferro livre e o direcionam para o armazenamento e transporte, respectivamente (Kohgo et al., 2008). Assim, o excesso de ferro pode estar mascarado por proteínas reguladoras desse elemento, portanto se faz necessário a análise de outros biomarcadores conjuntamente para definir se o ferro está ultrapassando os limites desejáveis.

A ferritina funciona como “captador” de ferro, diminuindo a disponibilidade desse íon para patógenos oportunistas (Thein, 2013). A ferritina circulante revela diretamente o estoque de ferro presente no organismo, sendo um dos principais parâmetros para o diagnóstico de anemia ferropriva e excesso de ferro (Grotto, 2010). É considerada um bom marcador dos níveis de ferro em comparação com a transferrina, níveis de ferro sérico e proteína C reativa (Rostoker et al., 2015) e encontra-se aumentada em doenças crônicas e inflamatórias, doenças

autoimunes e doenças hepáticas (Vanarsa et al.,2012). Nos indivíduos do estudo, o acúmulo de ferro em indivíduos que carregam o genótipo GG para o SNPs rs11264355 foi observado pelo aumento dos níveis de ferritina. Vale ainda ressaltar que o aumento de ferritina já foi visto em indivíduos PK deficientes que não apresentavam mutações nos genes de hemocromatose, indicando que essa é uma característica da anemia hemolítica (Mojzikova et al., 2014). Com isso, os dados sugerem que variações genéticas que contribuem para o fenótipo de elevação dos níveis de ferro (observado pelo dado de ferritina) em indivíduos saudáveis são alterações sutis que não contribuem para o quadro de anemia, mas sim para a desregulação da homeostase do ferro.

Outro parâmetro que indicou relação com a presença do alelo G foi a haptoglobina, que sugeriu aumento na presença do genótipo GG para os quatro SNPs analisados, apesar de não mostrar significância em indivíduos sadios. Todavia, o nível sérico de haptoglobina foi significativamente alterado na presença do alelo G para os SNPs rs11264355, rs11264359, rs4620533 e rs4971072 em pacientes. Este foi o único parâmetro medido neste grupo de indivíduos. Observamos também que o nível global de haptoglobina em pacientes apresentou-se significativamente aumentado quando comparado aos controles, o que seria esperado devido ao papel modulador da haptoglobina em desordens inflamatórias (Guetta et al., 2007). Curiosamente, o aumento significativo de haptoglobina em carreadores do genótipo GG para os quatro SNPs analisados é um efeito observado apenas entre pacientes. Sugerimos que a presença dos SNPs tem maior influência perante a infecção por *M. leprae* ou progressão para a hanseníase, ocasião em que a haptoglobina passa a ter um papel mais relevante.

Até o momento, a haptoglobina é descrita como a principal molécula na remoção de hemoglobina liberada pela ruptura de eritrócitos, e juntamente com o receptor CD163, forma o principal mecanismo de homeostase de hemácias e ferro na célula (Shaer et al., 2006). O aumento de haptoglobina é acompanhado da maior expressão de CD163, já observado em tuberculose, mostrando que a dependência desse receptor para a haptoglobina (Knudsen, 2005). Assim, o achado para haptoglobina corrobora os resultados para ferritina, uma vez que havendo maior liberação de hemoglobina em indivíduos que carregam o genótipo GG do SNP rs11264355, se torna necessário uma maior expressão de haptoglobina para conduzir a hemoglobina livre para dentro da célula.

Apesar dos esforços da célula hospedeira na ativação da resposta antimicrobiana, sabe-se que o *M. leprae* é capaz de subverter os mecanismos de defesa e modular a maquinaria celular a favor da sua disseminação (Hashimoto et al., 2002). Uma das estratégias do bacilo é utilizar as reservas de ferro da célula fagocítica para sustentar a infecção. Outros

fatores, associados às alterações em hemácias, parecem estar favorecendo a sobrevivência desse patógeno. Dados da literatura sugerem que a quebra de heme pela HO-1 (hemoxygenase-1), enzima que degrada o heme, induz a liberação de citocinas IL-10 e IL-4, regulando negativamente a resposta microbiana (Buechler, 2000). Além disso, a ligação do complexo Hb-Hp ao receptor CD163 também está correlacionado à liberação de IL-10 e outros mediadores anti-inflamatórios no macrófago *in vivo*. Por fim, o perfil de citocinas anti-inflamatórias induzidas por estes mecanismos poderia levar a uma resposta Th2, o qual é favorável para o desenvolvimento da hanseníase. Esse fato já foi visto em pacientes lepromatosos (Moura et al., 2012). Com isso, estes dados conduzem à ideia de que a predisposição provocada por um leve aumento de ferro na célula é fortalecida pela modulação negativa da atividade microbiana, induzindo a um perfil compatível com a sobrevivência do *M. leprae*.

Tendo em vista a atividade da piruvato kinase, esperava-se que a presença do alelo G relacionado aos “tag SNPs” rs11264359 e rs4971072 estaria associado às menores atividades da enzima em hemácias. Porém, isso não foi diretamente observado e a explicação pode ser elaborada. Trabalhamos aqui com células humanas, que apresentam uma grande variabilidade interindividual. Além disso, sabe-se que mesmo na deficiência da PK, os pacientes podem apresentar atividade enzimática normal ou aumentada (Miwa, 1980). Nem sempre o diagnóstico da deficiência é dado pela diminuição da atividade enzimática, frequentemente estes pacientes apresentam aumento de 2,3-difosfoglicerato e diminuição de ATP, características que auxiliam no diagnóstico. Estudos defendem que nem sempre as anemias são acompanhadas da diminuição de atividade da PK. Acredita-se que se a enzima deficiente for estável e constante, ela não é responsável pela destruição em massa de hemácias que geram a anemia hemolítica (Martinov et al., 2000). Aliás, a atividade enzimática também pode estar modificada por variações em outros genes, como o P5N (Miwa et al., 1985). Recentemente, van Oirschot e colaboradores sugeriram que existe um locus ainda não identificado que segrega independentemente do locus do *PKLR* e carrega mutações responsáveis pelo fenótipo de hiper-reatividade da PK. Acredita-se que esse locus esteja regulando o aumento da expressão da PK, e também possa estar relacionado à diminuição da atividade da PK em pacientes que não apresentam as mutações causais (van Oirschot et al., 2014). Com isso, resta-nos prosseguir cuidadosamente com a avaliação da atividade da PK, aumentando o número amostral e comparando aos dados da literatura também em amostras de pacientes.

Diante dos assuntos discutidos, a relação genética-funcional discorrida neste trabalho está resumida na Figura 6.1. Sugerimos que polimorfismos no gene ou regiões flanqueadoras do *PKLR* (Machado et al., 2010) poderiam estar diminuindo os níveis de ATP gerados pela piruvato kinase durante a glicólise. As hemácias de indivíduos que carregam o alelo G dos SNPs rs11264355, rs11264359, rs4620533 e rs4971072 sofreriam lise mais precocemente (devido a menor meia-vida), liberando hemoglobina no meio extracelular (Kaestner et al., 2014). A haptoglobina se liga aos dímeros de hemoglobina, formando um complexo que é internalizado para o macrófago mediante o receptor CD163. Dentro do macrófago, a enzima hemoxigenase (HO-1) quebra o heme em ferro (Fe^{+2}), bilirrubina e CO (Mendonça et al., 2012). O ferro liberado tem dois possíveis destinos dependendo da demanda de ferro do organismo. Se a necessidade for baixa, ele permanecerá na célula acoplado pela ferritina. Se houver necessidade de ferro, ele será transportado para fora da célula pela ferroportina, oxidado a Fe^{+3} para ser transportado pela transferrina (Tfr no plasma) (Grotto et al., 2008). Após a exposição e fagocitose do *M. leprae*, havendo condições vantajosas de sobrevivência, como uma sobrecarga de ferro, os bacilos conseguirão um nicho favorável para replicação.

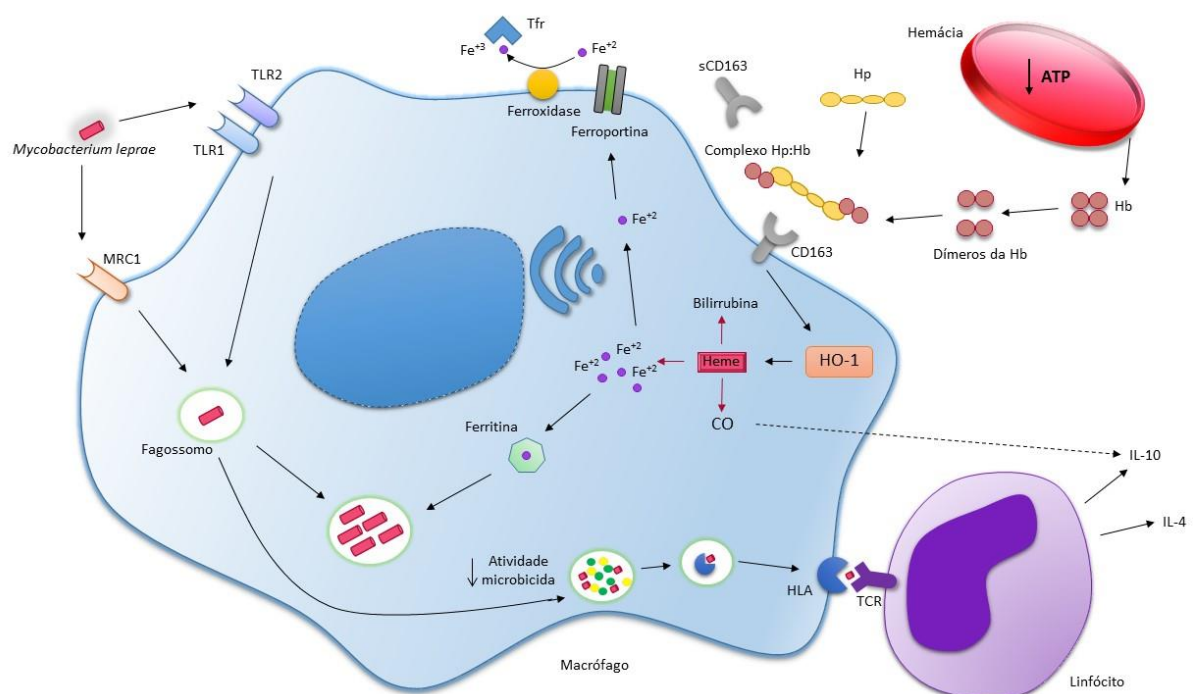


Figura 6.1 - Mecanismo de sobrevivência micobacteriana na presença de ferro. O esquema ilustra a possível via na qual o heme proveniente da lise de hemácias provoca a liberação de ferro no interior de macrófagos, que será utilizado para a sobrevivência do *Mycobacterium leprae*. A Hb liberada forma o complexo com a Hp e é internalizada via receptor CD163. A HO-1 catalisa a degradação do heme, liberando Fe^{+2} , que por sua vez pode seguir dois caminhos dependendo da necessidade da célula. Não havendo necessidade de exportar Ferro através

da Tfr, o ferro é acumulado na célula em forma de ferritina, favorecendo um nicho rico nesse elemento. Acredita-se que a presença do genótipo GG dos polimorfismos rs11264355, rs11264359, rs4620533 e rs4971072 esteja ligada à modulação de um perfil favorável à suscetibilidade a patógenos intracelulares. HO-1 - hemoxygenase; Hp – haptoglobina; Hb – hemoglobina; CO – monóxido de carbono; Trf – transferrina.

A hanseníase foi a primeira doença com caráter multigênico a ser descrita na literatura e representa um bom modelo de estudo de doenças infecciosas, já que a baixíssima variabilidade do *Mycobacterium leprae* fortalece a contribuição genética do hospedeiro para o desenvolvimento das formas clínicas (Alcaïs et al., 2009; Moraes et al., 2006). Além disso, considerando-se que as vias de regulação e ativação de resposta imune entre as doenças infecciosas se sobrepõem, é possível extrapolar a ocorrência de fatores de suscetibilidade para doenças que compartilham o mesmo tipo de interação patógeno-hospedeiro. Portanto, acreditamos que o modelo de associação do *PKLR* aqui estabelecido com base no modelo experimental de hanseníase pode também ocorrer para outros patógenos intracelulares.

Por fim, o presente trabalho sugere o efeito de pegadas evolutivas na população Africana com impacto direto em Brasileiros que levaria a uma variação funcional associada a suscetibilidade a patógenos intracelulares. Para o melhor entendimento dessa associação, devemos expandir o estudo dos SNPs na região do *PKLR*. Devemos considerar ainda que é provável que outros genes também estejam atuando nestes desfechos fenotípicos, considerando que existe uma gama de genes que regulam as concentrações de ferro no organismo. Por fim, os resultados apresentados no presente estudo podem contribuir para uma expansão do modelo atual de suscetibilidade genética à hanseníase, ao permitirem a inclusão de novos genes que participam dos mecanismos de suscetibilidade à doença.

7. CONCLUSÃO

O estudo permitiu ampliar os marcadores genéticos no gene *PKLR* associados com a suscetibilidade a hanseníase na população Brasileira. Assim, concluímos que:

- a) Os SNPs rs11264355, rs11264359, rs4620533 e rs4971072 (carreadores do alelo G) estão associados ao risco de desenvolvimento da hanseníase na população Brasileira, ao passo que os SNPs rs8177970 e rs8177963 não são informativos;
- b) O haplótipo rs11264355G/rs11264359G/rs4620533G/rs4971072G está associado a suscetibilidade à hanseníase na população Brasileira;
- c) Em Moçambicanos, os SNPs rs4620533 e rs4971072 não apresentaram associação com a tuberculose;
- d) A presença do genótipo GG para os SNPs 11264355 está associado ao aumento da ferritina em indivíduos saudáveis;
- e) Os níveis de haptoglobina são maiores em pacientes quando comparado aos controles, e o genótipo GG está associado aos maiores níveis de haptoglobina em pacientes;
- f) A atividade enzimática não sofreu alteração na presença do alelo G em hemácias e PBMC.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abel L, Demenais F. Detection of Major Genes for Susceptibility to Leprosy and Its Subtypes in a Caribbean Island: Desirade Island. *Am J Hum Genet.*1988;42:256-266.

Ali S, Vollaard AM, Widjaja S, Surjadi C, Vosse E, Dissel JT. PARK2/PACRG polymorphisms and susceptibility to typhoid and paratyphoid fever. *Clin Exp Immunol* 2006;144:425-431.

Ali S, Vollaard AM, Widjaja S, Surjadi C, Van De Vosse E, Van Dissel JT, et al. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. *Nature* 2009;33(3):1215.

Alcaïs A, Mira M, Casanova JL, Schurr E, Abel L. Genetic dissection of immunity in leprosy. *Curr Opin Immunol* 2005;17(1):44–48.

Alcaïs A, Alter A, Antoni G, Orlova M, Nguyen VT, et al. Stepwise replication identifies a low-producing lymphotoxin-alpha allele as a major risk factor for early onset leprosy. *Nat Genet* 2007;39:517-522.

Alcaïs A, Abel L, Casanova JL. Human genetics of infectious diseases: between proof of principle and paradigm. *J. Clin. Invest.* 2009;119:2506–2514.

Alter A, de Leseleuc L, Van Thuc N, Thai VH, Huong NT, Ba NN, Cardoso CC, et al. Genetic and functional analysis of common MRC1 exon 7 polymorphisms in leprosy susceptibility. *Human genetics* 2010;127(3):337-348.

Alter A, Grant A, Abel L, Alcaïs A, Schurr E. Leprosy as a genetic disease. *Mamm Genome.* 2011;22(1-2): 19-31.

Alter A, Fava V, Huong N, Singh M, Orlova M, et al. Linkage disequilibrium pattern and age-at-diagnosis are critical for replicating genetic associations across ethnic groups in leprosy. *Hum Genet* 2013;132:107–116.

Alves J, Machado P, Silva J, Gonçalves N, Ribeiro L, Faustino P, et al. Analysis of malaria associated genetic traits in Cabo Verde, a melting pot of European and sub Saharan settlers. *Blood Cells Mol Dis* 2010;44(1):62-8.

Antunes SL, Chimelli L, Jardim MR, Vital RT, Nery JA, et al. Histopathological examination of nerve samples from pure neural leprosy patients: obtaining maximum information to improve diagnostic efficiency. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012;107(2):246-253.

Ayi K, Min-Oo G, Serghides L, Crockett M, Kirby-Allen M, Quirt I, Gros P & Kain KC. PYRivate Kinase Deficiency and Malaria. *N Engl J Med* 2008;358(17):1805-1810.

Ayi K, Liles WC, Gros P, Kain KC. Adenosine Triphosphate Depletion of Erythrocytes Simulates the Phenotype Associated with PYRivate Kinase Deficiency and Confers Protection against *Plasmodium falciparum* In Vitro. *JID* 2009;200:1289–99.

Basu J, Dong-Min S, Eun-Kyeong J. Mycobacterial signaling through toll-like receptors. *Front Cell Infect Microbiol* 2012 Nov;2(145):1-6.

Baynes RD, Flax H, Bothwell TH, Bezwoda WR, MacPhail AP, Atkinson P, Lewis D. Haematological and iron-related measurements in active pulmonary tuberculosis. *Scand J Haematol* 1986;36:280–287.

Berghout J, Higgins S, Loucoubar C, Sakuntabhai A, Kain KC, Gros P. Genetic diversity in human erythrocyte pYRivate kinase. *Genes Immun.* 2012 Jan;13(1):98-102.

Berrington WR, Macdonald M, Khadge S, Khadge S, Sapkota BR, Janer M, et al. Common polymorphisms in the NOD2 generegion are associated with leprosy and its reactive states. *J Infect Dis* 2010;201(9):1422–35.

Beutler E. Red cell metabolism. A manual of biochemical methods. 6th ed. Orlando: Grune & Stration. 1975.

Bochud PY, Sinsimer D, Aderem A, Siddiqui MR, Saunderson P, Britton S, et al. Polymorphisms in Toll-like receptor 4 (TLR4) are associated with protection against leprosy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009 Sep;28(9):1055-65.

Boradia VM, Malhotra H, Thakkar JS, Tillu VA, Vuppala B, Patil P, Sheokan N, Sharma P, Chauhan AS, Raje M & Raje CI. Mycobacterium tuberculosis acquires iron by cell-surface sequestration and internalization of human-hollo transferase. *Nature Communications* 2014;5:4370.

Buechler C, Ritter M, Orsó E, Langmann T, Klucken J, Schmitz G. Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *J Leukoc Biol* 2000 Jan;67(1):97-103.

Cao Y, Wang X, Cao Z, Cheng X. Association of Vitamin D receptor gene TaqI polymorphisms with tuberculosis susceptibility: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* 2015;8(6):10187-10203.

Cardon LR, Bell JI. Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet* 2001 Feb;2(2):91-9.

Cardon LR, Palmer LJ. Population stratification and spurious allelic association. *Lancet* 2003 Feb;361:598-604.

Cardoso CC, Pereira AC, Sales-Marques C, Moraes MO. Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. *Future Microbiol* 2011;6(5):533-549.

Cardoso CC, Pereira AC, Brito-de-Souza VN, et al. TNF γ -308 G/A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians: A genetic epidemiology assessment, meta-analysis, and functional study. *J Infect Dis* 2010;204:1256-1263.

Casanova JL, Abel L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annu Rev Immunol* 2002;20:581-620.

Casanova JL, Abel L. Human genetics of infectious diseases: a unified theory. *EMBO J* 2007 Feb;26(4):915-22.

Cézar-de-Melo PFT, Toledo-Pinto TG, Marques CS, Arnez LEA, Cardoso CC, Guerreiro LTA, Antunes slg, et al. Pre-miR-146a (rs2910164 G.C) Single Nucleotide Polymorphism Is Genetically and Functionally Associated with Leprosy. *PLOS Negl Trop Dis* 2014;8(9):e3099.

Chapman SJ, Hill AV. Human genetic susceptibility to infectious disease. *Nat Rev Genet.* 2012;13:175-188.

Chopra R, Kalaiarasan P, Ali S, Srivastava AK, Aggarwal S, Garg VK, Bhattacharya SN, et al. PARK2 and proinflammatory/anti-inflammatory cytokine gene interactions contribute to the susceptibility to leprosy: a case–control study of North Indian population. *BMJ* 2014;4:e004239..

Cocito C, Delville J. Biological, chemical, immunological and staining properties of bacteria isolated from tissues of leprosy patients. *Eur J Epidemiol* 1985;1(3):202-31.

Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry III CE, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998 Jun;393(6685), 537-44.

Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James D, Thomson NR, Wheeler PR, Honore A N, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* 2001;409(6823): 1007-11.

Colin M. Hansen's disease - evolution of ideas. *Acta Leprol.* 1981 Apr-Jun;(83):41-51.

Dawn TM, Barret JH. Genetic linkage studies. *Lancet* 2005;366:1036-44.

de Back Z, Kostova EB, van Kraaij M, van den Berg TK, van Bruggen R. Of macrophages and red blood cells; a complex love story. *Front Physiol.* 2014 Jan 30;5:9.

Delaby C, Pilard N, Hetet G, Driss F, Grandchamp B, Beaumont C, Canonne-Hergaux F. A physiological model to study iron recycling in macrophages. *Exp Cell Res.* 2005 Oct 15;310(1):43-53.

Deps PD, Faria LV, Gonçalves VC, Silva DA, Ventura, CG, Zandonade E. Aspectos epidemiológicos da transmissão da hanseníase em relação a exposição ao tatu. *Hansen Int* 2003;28(2):138-144.

Douvas GS, May MH, Crowle AJ. Transferrin, iron, and serum lipids enhance or inhibit *Mycobacterium avium* replication in human macrophages. *J Infect Dis* 1993 Apr;167(4):857-64.

de Sales-Marques C, Brito-de-Souza VN, Guerreiro LTA, Martins JH, Amaral EP, Cardoso CC, Dias-Batista IMF, Silva WL, Nery JAC, Medeiros P, Gigliotti P, Campanelli AP, Virmond M, Sarno EN, Mira MT, Lana FCF, Caffarena ER, Pacheco AG, Pereira AC & Moraes MO. Toll-like Receptor 1 N248S Single-Nucleotide Polymorphism Is Associated With Leprosy Risk and Regulates Immune Activation During Mycobacterial Infection. *JID* 2013;1-10.

de Sales-Marques, C, Salomão H, Fava VM, Alvarado-Arnez LE, Amaral EP, Cardoso CC, Dias-Batista IDF, Silva WL, Medeiros P, Virmond MCL, Lana FCF, Pacheco AG, Moraes MO, Mira MT & Latini ACP. NOD2 and CCDC122-LACC1 genes are associated with leprosy susceptibility in Brazilians. *Hum Genet* 2014;133:1525–1532.

de Voss JJ, Rutter K, Schroeder BG, Barry CE III. Iron acquisition and metabolism by mycobacteria. *J. Bacteriol* 1999;181:4443-4451.

de Voss JJ, Rutter K, Schroeder BG, Su H, Zhu Y, Barry CE III. The salicylate-derived mycobactin siderophores of *Mycobacterium tuberculosis* are essential for growth in macrophages. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97:1252–1257.

Donovan A, Roy CN, Andrews NC. The Ins and Outs of Iron Homeostasis. *Physiology* 2006;21:115-123.

Drüppe NC, Camacho LAB, Saler AM, Illarramendi X, Nery JAC, Sampaio EP, Sarno E, BühnerSékula S. Impact of PGL-I Seropositivity on the Protective Effect of BCG Vaccination among Leprosy Contacts: A Cohort Study. *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6(6):e1711.

Durand PM, Coetzer TL. PYRIvate kinase deficiency protects against malaria in humans. *Haematologica* 2008 Jun;93(6):939-40.

Dussurget O, Rodriguez M, Smith I. An *ideR* mutant of *M smegmatis* has derepressed siderophore production and an altered oxidative stress response. *Molecular Microbiology* 1996;22(3): 535-544.

Dussurget O, Smith I. Interdependence of mycobacterial iron regulation, oxidative-stress response and isoniazid resistance. *Elsevier Science* 1998;6(9):354-358.

Eichelmann K, González SEG, Salas-Alanis JC & Ocampo-Candiani J. Leprosy. An Update: Definition, Pathogenesis, Classification, Diagnosis, and Treatment. *Actas Dermosifiliogr* 2013;104(7):554-563.

Fabri M, Stenger S, Shin DM, Yuk JM, Liu PT, Realegeno S, et al. Vitamin D is required for IFN-gamma-mediated antimicrobial activity of human macrophages. *Sci Transl Med* 2011 Oct;3(104):104ra102.

Feitosa MF, Borecki I, Krieger H, Beiguelman B, Rao DC. The Genetic Epidemiology of Leprosy in a Brazilian Population. *Am J Hum Genet.* 1995;56:1179-1185.

Finch CA, Huebers H. Perspectives in iron metabolism. *N Engl J Med* 1982;306:1520-1528.

Fine PEM, Stern JA, Pönnighaus JM, Saiu J, Chihana A, Munthali M, Warndorff DK, et al. Household and dwelling contact as risk factors for leprosy in the Northern Malawi. *Am J Epidemiol* 1997;146:91-102.

Finkelstein RA, Sciortino CV, McIntosh MA. Role of iron in microbe-host interactions. *Rev Infect Dis* 1983;5:S759-777

Fiss EH, Yu S, Jacobs WR. Identification of genes involved in the sequestration of iron in mycobacteria the ferric exochelin biosynthetic and uptake pathways. *Molecular Microbiology* 1994;14(3):557-569.

Fitness J, Floyd S, Warndorff, DK, Sichali L, Mwaungulu L, Crampin AC, Fine PEM & Hill AVS. Large-scale candidate gene study of leprosy susceptibility in the Karonga district of northern Malawi. *Am J Trop Med Hyg* 2004;71(3):330–340.

Hagge DA, Saunders BM, Ebenezer GJ, et al. Lymphotoxin-alpha and TNF have essential but independent roles in the evolution of the granulomatous response in experimental leprosy. *Am J Pathol.* 2009;174:1379-1389

Gay NJ, Gangloff M. Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annu Rev Biochem* 2007;76:141-165.

Gobin J, Horwitz MA. Exochelins of *Mycobacterium tuberculosis* Remove Iron from Human Iron-binding Proteins and Donate Iron to Mycobactins in the *M. tuberculosis* Cell Wall. *J Exp Med* 1996;183:1527-1532.

Guerreiro LT, Robottom-Ferreira AB, Ribeiro-Alves M, Toledo-Pinto TG, Rosa Brito T, Rosa PS, et al. Gene expression profiling specifies chemokine, mitochondrial and lipid metabolism signatures in leprosy. *PLoS One* 2013 Jun;8(6):e64748.

Grant AV, Alter A, Huong NT, Orlova M, Thuc NV, Ba NN, Thai VH, et al. Crohn's Disease Susceptibility Genes are Associated With Leprosy in the Vietnamese Population. *JID* 2012;206:1763-7.

Grant VA. CUBN and NEBL common variants in the chromosome 10p13 linkage region are associated with multibacillary leprosy in Vietnam. *Hum Genet* 2014 Jul;133(7):883-93.

Grotto HZW. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. *Rev Bras de Hematol Hemoter* 2008;30(5):390-397.

Grotto HZW. Diagnóstico laboratorial da deficiência de ferro. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2010;32(2):22-28.

Guetta J, Strauss M, Levy NS, Fahoum L, Levy AP. Haptoglobin genotype modulates the balance of Th1/Th2 cytokines produced by macrophages exposed to free hemoglobin. *Atherosclerosis* 2007 Mar;191(1):48-53.

Guinto RS, Rodrigues JN. A field study of leprosy in Talisay, Cebu. *Int J Lep* 1941;9:149-166.

Hashimoto K, Maeda Y, Kimura H, Suzuki K, Masuda A, Matsuoka M, Makino M. Mycobacterium leprae infection in monocyte-derived dendritic cells and its influence on antigen-presenting function. *Infect Immun* 2002 Sep;70(9):5167-76.

Hansen GA. Investigations concerning the etiology of leprosy. *Norsk Mag Laegervidenskaben* 1874;4:1-88.

Hart BE, Tapping RI. Differential trafficking of TLR1 I602S underlies host protection against pathogenic mycobacteria. *J Immunol* 2012 Dec;189(11):5347-5355.

Hedrick PW. Population genetics of malaria resistance in humans. *Heredity* 2011;107:283-304.

Hunter SW, Brennan PJ. A Novel Phenolic Glycolipid from *Mycobacterium leprae* Possibly Involved in Immunogenicity and Pathogenicity. *Journal of Bacteriology* 1981;147(3):728-735.

Hulse EV. Leprosy and ancient Egypt. *Lancet*. 1972;2(7785):1024-1025.

Jacobash G, Rapoport SM. Hemolytic Anemias Due to Erythrocyte Enzyme Deficiencies. *Institute of Biochemistry* 1996;3:143-170.

Jardim MR, Antunes SL, Santos AR, Nascimento OJ, Nery JA, Sales AM, Illarramendi X, Duppre N, Chimelli L, Sampaio EP, Sarno EP. Criteria for diagnosis of pure neural leprosy. *J Neurol* 2003;250(7):806-9.

Joyce MP. Historic aspects of human susceptibility to leprosy and the risk of conjugal transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012;107(Suppl D):17-21.

Kaestner L, Bogdanova A. Regulation of red cell life-span, erythropoiesis, senescence, and clearance. *Front Physiol* 2014 Jul;5:269.

Kahawita IP, Walker SL, Lockwood DNJ. Leprosy type 1 reactions and erythema nodosum leprosum. *An Bras Dermatol* 2008;83(1):75-82.

Kapoor N, Pawar S, Sirakova TD, Deb C, Warren WL, Kolattukudy PE. Human granuloma in vitro model, for TB dormancy and resuscitation. *PLoS One*. 2013;8(1):e53657.

Ke Z, Yuan L, Ma J, Zhang X, Guo Y, Xiong H. *IL-10* Polymorphisms and Tuberculosis Susceptibility: An Updated Meta-Analysis. *Yonsei Med J* 2015 Sep;56(5):1274-1287.

Kirchheimer WF. Experimental Leprosy in the Nine-Banded Armadillo. *Public Health Rep* 1975 Nov;90(6):483-485.

Knudsen TB, Gustafson P, Kronborg G, Kristiansen TB, Moestrup SK, Nielsen JO, et al. Predictive value of soluble haemoglobin scavenger receptor CD163 serum levels for survival in verified tuberculosis patients. *Clin Microbiol Infect* 2005 Sep;11(9):730-5.

Kober PA, Graves SS. Nephelometry: (Photometric analysis) I-History of method and development of instruments. *Ind Eng Che* 1915 Ago;7(10):843-844.

Kohgo Y, Ikuta K, Ohtake T, Torimoto Y, Kato J. Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload. *Int J Hematol* 2008 Jul;88(1):7-15.

Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SK, Moestrup SK. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 2001 Jan;409(6817):198-201.

Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA, Uematsu S, Ng YW, Legaspi A, et al. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nat Med.* 2003;9:525- 532. 87.

Krutzik SR, Modlin RL. The role of Toll-like receptors in combating mycobacteria. *Semin Immunol* 2004 Feb;16(1):35-41.

Kuhn R, Lohler J, Rennick D, et al. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993;75:263-274

Kwiatkowski DP. How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria. *Am J Hum Genet* 2005 Aug;77(2):171-92.

Lacronique V, Boquet D, Lopez S, Kahn A, Raymondjean M. In vitro and in vivo protein - DNA interactions on the rat erythroid-specific L' pYRIvate kinase gene promoter. *Nucleic Acids Research* 1992;20(21):5669-5676.

Lambrecht RS, Collins MT. Inability to detect mycobactin in mycobacteria-infected tissues suggests an alternative iron acquisition mechanism by mycobacteria in vivo. *Microb Pathog* 1993;14:229–238.

Lastória JC, Abreu MAMM. Hanseníase: diagnóstico e tratamento. *Diagn tratamento* 2012;17(4):173-9.

Lima-Bezerra OC. Estudo caso-controle de polimorfismos no gene PKLR e associação com a hanseníase. Monografia [UNIRIO] – Instituto Oswaldo Cruz; 2013.

Lins TC, Vieira RG, Abreu BS, Grattapaglia D, Pereira RW. Genetic Composition of Brazilian Population Samples Based on a Set of Twenty Eight Ancestry Informative SNPs. *Am J Hum Biol* 2010 Mar;22(2):187-92.

Liu PT, Wheelwright M, Teles R, Komisopoulou E, Edfeldt K, Ferguson B, et al. MicroRNA21 targets the vitamin D-dependent antimicrobial pathway in leprosy. *Nat Med* 2012;18(2):267-73.

Mabunda NEJ. Estudo de polimorfismos de TNF, IL-10, LTA4H, PKLR e associação com a tuberculose na população Moçambicana. Dissertação [mestrado em Biologia Celular e Molecular] - Instituto Oswaldo Cruz; 2013.

Machado P, Pereira R, Rocha AM, Manco L, Fernandes N, Miranda J, et al. Malaria: looking for selection signatures in the human PKLR gene region. *Br J Haematol* 2010 Jun;149(5):775-84.

Machado P, Manco L, Gomes C, Mendes C, Fernandes N, Salomé G, et al. PYRIvate kinase deficiency in sub-Saharan Africa: identification of a highly frequent missense mutation (G829A;Glu277Lys) and association with malaria. *PLoS One* 2012;7(10):e47071.

Magalhães MCC, Rojas LI. Diferenciação territorial da hanseníase no Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 2007;16(2):75 – 84.

Malhotra D, Darvishi K, Sood S, Sharma S, Grover C, et al. IL-10 promoter single nucleotide polymorphisms are significantly associated with resistance to leprosy. *Human genetics* 2005;118:295-300.

Manta FSN, Pereira R, Vianna R, Araújo ARB, Gitaí DLG, Silva DA, et al. Revisiting the genetic ancestry of Brazilians using autosomal AIM-Indels. *PLoS One* 2013 Sep;8(9):e75145.

Manzanillo PS, Ayres JS, Watson RO, Collins AC, Souza G, Rae CS, Schneider DS, Nakamura K, et al. PARKIN ubiquitin ligase mediates resistance to intracellular pathogens. *Nature*. 2013 September 26; 501(7468):1-16.

Marchini J, Cardon LR, Phillips MS, Donnelly P. The effects of human population structure on large genetic association studies. *Nat Genet* 2004 May;36(5):512-7.

Martinez AN, Britto CFP, Nery JAC, Sampaio EP, Jardim MR, Sarno EN, Moraes MO. Evaluation of Real-Time and Conventional PCR Targeting Complex 85 Genes for Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in Skin Biopsy Samples from Patients Diagnosed with Leprosy. *J Clin Microbiol* 2006;44(9):3154–59.

Martinez AN, Alvez MR, Sarno ER, Moraes MO. Evaluation of qPCR-Based Assays for Leprosy Diagnosis Directly in Clinical Specimens. *Plos Ntds* 2011;5(10):1:8.

Martinez TS, Figueira MM, Costa AV, Gonçalves MA, Goulart LR, Goulart IM. Oral mucosa as a source of *Mycobacterium leprae* infection and transmission, and implications of bacterial DNA detection and the immunological status. *Clin Microbiol Infect* 2010;7(11):1653-8

Martinez TS, Talhari C, Moraes MO, Talhari S. PCR-based techniques for leprosy diagnosis: from the laboratory to the clinic. *PLoS Negl Trop Dis* 2014 Apr;8(4):e2655.

Martinov MV, Plotnikov AG, Vitvitsky VM, Ataulakhanov FI. Deficiencies of glycolytic enzymes as a possible cause of hemolytic anemia. *Biochim Biophys Acta* 2000 Mar;1474(1):75-87.

Marquet S, Schurr E. Genetics of susceptibility to infectious diseases: tuberculosis and leprosy as examples. *Drug Metab Dispos* 2001;29:479-83.

Mattos KA, Oliveira VG, D'Avila H, Rodrigues LS, Pinheiro RO, Sarno EN, et al. TLR6-driven lipid droplets in *Mycobacterium leprae*-infected Schwann cells: Immunoinflammatory platforms associated with bacterial persistence. *J Immunol* 2011;187:2548-2558.

McCready KA, Ratledge C. Amounts of iron, heme and related compounds in *Mycobacterium smegmatis* grown in various concentrations of iron. *Biochem Soc* 1978;6:421–423.

Mendonça VRR, Luz NF, Santos NJG, Borges VM, Gonçalves MS, Andrade BB, Barral-Netto M. Association between the haptoglobin and heme oxygenase 1 genetic profiles and soluble CD163 in susceptibility to and severity of human malaria. *Infect Immun* 2012 Apr;80(4):1445–1454.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 1988;6(13):1215.

Ministério da Saúde. Boletim da Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação Geral de Doenças Endêmicas. Área Técnica de Dermatologia Sanitária. Brasília. 2015.

Ministério da Saúde. Situação epidemiológica da hanseníase no Brasil – 2011. Secretaria de Vigilância em Saúde, SINAN. 2011.

Min-Oo G, Fortini a, Tam MF, Nantel A, Stevenson MM, Gros P. pYRIvate kinase deficiency in mice protects against malaria. *Nat Genet* 2003 Dec;35(4):357-62.

Min-Oo G, Fortin A, Tam MF, Gros P, Stevenson MM. Phenotypic expression of pYRIvate kinase deficiency and protection against malaria in a mouse model. *Genes Immun*. 2004 May;5(3):168-75.

Min-Oo G, Gros P. Erythrocyte variants and the nature of their malaria protective effect. *Cellular Microbiology* 2005;7(6):753–763.

Mira MT, Alcais A, Van Thuc N, et al. Chromosome 6 q25 is linked to susceptibility to leprosy in a Vietnamese population. *Nat Genet*. 2003a;33:412-415.

Mira MT, Alcais A, Pietrantonio T, Thuc NV, Phuong MC, Abel L, Schurr E. Segregation of HLA/TNF region is linked to leprosy clinical spectrum in families displaying mixed leprosy subtypes. *Genes Immunity*, 2003b;4:67–73.

Mira MT, Acaïs A, Thuc NV, Moraes MO, Flumeri CD, Thai VH, et al. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature* 2004;427:636-639.

Mira MT. Genetic host resistance and susceptibility to leprosy. *Microbes Infection* 2006;8: 1124-1131.

Misch EA, Macdonald M, Ranjit C. Human TLR1 deficiency is associated with impaired mycobacterial signaling and protection from leprosy reversal reaction. *PLoS Negl Trop Dis* 2008;2:e231.

Miwa S, Fujii H, Takegawa S, Nakatsuji T, Yamato K, Ishida Y, Ninomiya N. Seven pYRIvate kinase variants characterized by the ICSH recommended methods. *Br J Haematol* 1980 Aug;45(4):575-83.

Miwa S, Fujii H. Molecular aspects of erythroenzymopathies associated with hereditary hemolytic anemia. *Am J Hematol* 1985 Jul;19(3):293-305.

Mojzikova R, Koralkova P, Holub D, Zidova Z, Pospisilova D, Cermak J, et al. Iron status in patients with pYRIvate kinase deficiency: neonatal hyperferritinaemia associated with a novel frameshift deletion in the PKLR gene (p.Arg518fs), and low hepcidin to ferritin ratios. *Br J Haematol* 2014 May;165(4):556-63.

Molto JE. Leprosy in Roman Period Burials from Kellis 2: Dakhleh, Egypt. *Am J Phys Anthropol* 2002;113(1):103-9.

Monot M, Honore N, Garnier T, Araoz R, Coppee J-Y, et al. On the Origin of Leprosy. *Science* 2005;308(5724): 040–1042.

Monot M, Honoré N, Garnier T, Zidane N, Sherafi D, Paniz-Mondolfi A, Matsuoka M, Taylor GM, Donoghue HD, Bouwman A, Mays S, Watson C, et al. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. *Nat Genet* 2009;41(12):1282-9.

Moraes MO, Sarno EN, Almeida AS, Saraiva BC, Nery JA, Martins RC, Sampaio EP. Cytokine mRNA expression in leprosy: a possible role for interferon-gamma and interleukin-12 in reactions (RR and ENL). *Scand J Immunol* 1999;50:541-549.

Moraes MO, Pacheco AG, Schonkeren JJ, Vanderborght PR, Nery JA, Santos AR, Moraes ME, et al. Interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms as markers for disease susceptibility. *Genes and Immunity* 2004;5:592–595.

Moraes MO, Cardoso CC, Vanderborght PR, Pacheco AG. Genetics of host response in leprosy. *Lepr Rev* 2006;77(3):189-202.

Moyo VM, Gangaidzo IT, Gordeuk VR, Kiire CF, Macphail AP. Tuberculosis and iron overload in Africa: a review. *Cent Afr J Med* 1997;43:334–339.

Moura RS, Calado KL, Oliveira MLW, Bühner-Sékula S. Sorologia da hanseníase utilizando PGL-I: revisão sistemática [Leprosy serology using PGL-I: a systematic review]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008;41(supl 2):11-8.

Moura DF, Mattos KA, Amadeu TP, Andrade PR, Sales JS, et al. CD163 favors *Mycobacterium leprae* survival and persistence by promoting anti-inflammatory pathways in lepromatous macrophages. *Eur J Immunol* 2012;42:2925–2936.

Moura RS, Penna GO, Fujiwara T, Pontes MA, Cruz R, Gonçalves Hde S, Penna ML, Cardoso LP, Stefani MM, Bühner-Sékula S. Evaluation of a rapid serological test for leprosy classification using human serum albumin as the antigen carrier. *J Immunol Methods*. 2014 Oct;412:35-41.

Muñoz ME, Ponce E. PYRivate kinase: current status of regulatory and functional properties. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2003 Jun;135(2):197-218.

Murray MJ, Murray AB, Murray MB, Murray CJ. The adverse effect of iron repletion on the course of certain infections. *Br Med J* 1978;2:1113–1115.

Nakashima K, Miwa S, Fuji H, Shinohara K, Yamauchi K, Tsuki Y, Yanai M. Characterization of pYRIvate kinase from the liver of a patient with aberrant erythrocyte pYRIvate kinase, PK Nagasaki. *J Lab Clin Med* 1977;1(6):1012-20.

Nath I, Saini C, Valluri VL. Immunology of leprosy and diagnostic challenges. *Clinics in Dermatology* 2015; 33(1):90–8.

Neela VSK, Suryadevara NC, Shinde VG, Pydi SS, Jain S, Singh SS, et al. Association of Taq I, Fok I and Apa I polymorphisms in Vitamin D Receptor (VDR) gene with leprosy. *Human Immunol* 2015;1-4.

Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, *et al.* IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest* 2004;113(9):1271-6.

Newport MJ, Finan C. Genome-wide association studies and susceptibility to infectious diseases. *Brief Func Genomics* 2011;10(2):98-107.

Nicolielo DB, Ferreira RIP, Leite AA. Atividade da 6-fosfogliconato desidrogenase em deficientes de glicose-6-fosfato desidrogenase. *Rev bras hematol hemoter* 2006;28(2):135-138.

Noguchi T, Inoue H, Tanaka T. The MI- and M2-type Isozymes of Rat PYRIvate Kinase Are Produced from the Same Gene by Alternative RNA Splicing. *J Biol Chem* 1986;261(29):13807-13812.

Noguchi T, Yamada K, Inoue H, Matsuda T, Tanaka T. The L- and R-type Isozymes of Rat PYRIvate Kinase Are Produced from a Single Gene by Use of Different Promoters. *J Biol Chem* 1987 Oct;262(29):14366-71.

Nogueira MES, Coelho KIR, Fleury RN, Arrudas MSP. Inoculação de *Mycobacterium leprae* na bolsa jugal do hamster. *Hansen Int* 1999;24(1): 5-14.

Olakanmi O, Schlesinger LS, Ahmed A & Britigan BE. The Nature of Extracellular Iron Influences Iron Acquisition by *Mycobacterium tuberculosis* Residing within Human Macrophages. *Infection and Immunity* 2004;72(4):2022–2028.

Organização Mundial da Saúde. Chemotherapy of leprosy for control programmes. WHO Tech Rep Ser 675; 1982.

Organização Mundial da Saúde. Global leprosy situation 2012. *Wkly Epidemiol Rec* 2013;87:317-28.

Organização Mundial da Saúde. Global tuberculosis report 2014. *Wkly Epidemiol Rec* 2014;11-14.

Oski FA, Diamond LK. Erythrocyte pYRIvate kinase deficiency resulting in congenital nonspherocytic hemolytic anemia. *N Engl J Med* 1963 Oct;269:763-70.

Otto TD, Vasconcellos EA, Gomes LHF, Moreira AS, Degraive WM, Mendonça-Lima L, Alves-Ferreira M. ChromaPipe: a pipeline for analysis, quality control and management for a DNA sequencing facility. *Genet Mol Res* 2008;7(3):861-871.

Pacheco AG, Moraes MO. Genetic polymorphisms of infectious diseases in case-control studies. *Dis Markers* 2009;27:173–186.

Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 2001;276(11):7806-10.

Patrocínio LG, Goulart IMB, Goulart LR, Patrocínio JA, Ferreira FR, Fleury RN. Detection of *Mycobacterium leprae* in nasal mucosa biopsies by the polymerase chain reaction. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005 Jun;44(3):311-6.

Pearson TA, Manolio TA. How to interpret a genome-wide association study. *JAMA* 2008;299:1335-1344.

Penna LF, Oliveira MLDR, Penna GO. The epidemiological behaviour of leprosy in Brazil. *Lepr Rev.* 2009;80: 332–344.

Pessolani MCV, Smith DR, Rivoire B, McCormick J, Hefta SA, Cole SST, Brennan PJ. Purification, Characterization, Gene Sequence, and Significance of a Bacterioferritin from *Mycobacterium leprae*. *Exp Med* 1994;180:319-327.

Pinto TGT. Interação patógeno-hospedeiro na hanseníase: indução da via de interferon tipo I como potencial mecanismo de sobrevivência do *Mycobacterium leprae* em macrófagos humanos. Tese [mestrado em Biologia Celular e Molecular] - Instituto Oswaldo Cruz; 2013.

Prevedello FC, Mira MT. Hanseníase: uma doença genética? *An Bras Dermatol* 2007;82(5):451-9.

Purohit P, Dehury S, Patel S, Patel DK. Prevalence of deletional alpha thalassemia and sickle gene in tribal dominated malaria endemic area of eastern India. *ISRN Hematol* 2014 Mar 11;2014:745245.

Reich DE, Cargill M, Bolk S, et al. Linkage disequilibrium in the human genome. *Nature* 2001;411(6834):199–204.

Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1966;34:255-273.

Risch NJ. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature* 2000 Jun;405(6788):847-56.

Roach DR, Briscoe H, Saunders B, et al. Secreted lymphotoxin-alpha is essential for the control of an intracellular bacterial infection. *J Exp Med* 2001;193:239-246.

Robbins G, Tripathy VM, Misra, VN, Mohanty RK, Shinde VS, Gray KM, Schug MD. Ancient Skeletal Evidence for Leprosy in India (2000 B.C.). *PLoS ONE* 2009; 4(5):1-8.

Robottom-Ferreira AB. Estudos moleculares da interação entre o *Mycobacterium leprae* e a célula de Schwann: uma abordagem de expressão gênica. Tese [doutorado em Biologia Computacional e Sistemas] - Instituto Oswaldo Cruz; 2011.

Rodriguez GM, Gold B, Gomez M, Dussurget O, Smith I. Identification and characterization of two divergently transcribed iron regulated genes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber Lung Dis* 1999;79(5):287-98.

Rodriguez GM, Smith I. Identification of an ABC transporter required for iron acquisition and virulence in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 2006;188:424-430.

Rostoker G, Griuncelli M, Loridon C, Magna T, Machado G, Drahi G, et al. Reassessment of Iron Biomarkers for Prediction of Dialysis Iron Overload: An MRI Study. *PLoS One*. 2015 Jul 16;10(7):e0132006.

Roy MF, Riendeau N, Bédard C, Hélie P, Min-Oo G, Turcotte, et al. PYRIvate kinase deficiency confers susceptibility to *Salmonella typhimurium* infection in mice. *JEM* 2007;204(12):2949-2961.

Roy S, McGuier W, Mascie-Taylor CGN, Saha B, Hazra SK, Hill AVS, et al. Tumor necrosis Factor Promoter Polymorphism and Susceptibility to Lepromatous Leprosy. *JID* 1997;176:530-533.

Roy S, Frodsham B, Hazra SK, Mascie-Taylor CGN, Hill AVS. Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. *J Infect Dis* 1999;179(1):187e191.

Sallakci N, Coskuna M, Berberb Z, Gürkanc F, Kocamazc H, et al. Interferon- γ gene+874T – A polymorphism is associated with tuberculosis and gamma interferon response. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 2007;87:225-230.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 1977 Dec;74(12):5463-7.

Santos AR, Nery JC, Duppre NC, Gallo MEN, Filho JTG, Suffys PN, Degrave WM. Use of the polymerase chain reaction in the diagnosis of leprosy. *J Med Microbiol* 1997;46:170-172.

Santos AR, Almeida AS, Suffys PN, et al. Tumor necrosis factor promoter polymorphism (TNF2) seems to protect against development of severe forms of leprosy in a pilot study in Brazilian patients. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 2000;68(3):325–327.

Santos AR, Suffys PN, Vanderborcht PR, Moraes MO, Vieira LMM, Cabello PH, Bakker AM, Matos HJ, Huizinga TWJ, Ottenhoff THM, Sampaio EP, Sarno EN. Role of Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-10 Promoter Gene Polymorphisms in Leprosy. *JID*, 2002;186:1687-1691.

Sapkota BR, Macdonald M, Berrington WR, Misch EA, Ranjit et al. Association of TNF, MBL, and VDR polymorphisms with leprosy phenotypes. *Hum Immunol* 2010;71:992-998.

Satoh H, Tani K, Yoshiba MC, Sasaki M, Miwa S & Fujii H. The human liver-type pYRIvate kinase (PKL) gene is on chromosome 1 at band q21. *Cytogenet Cell Genet* 1988;47:132-133.

Sauer MED, Salomão H, Ramos JB, D'Espindula HRS, Rodrigues RSA, Macedo WC, Sindeaux RHM, Mira MT. Genetics of leprosy: Expected and unexpected developments and perspectives. *Clinics in Dermatology*. 2015;33:99–107.

Schaer DJ, Schleiffenbaum B, Kurrer M, Imhof A, Böchli E, Fehr J, Moller HJ, et al. Soluble hemoglobin-haptoglobin scavenger receptor CD163 as a lineage-specific marker in the reactive hemophagocytic syndrome. *Eur J Haematol* 2005;74:6-10.

Schaer DJ, Schaer CA, Buehler PW, Boykins RA, Schoedon G, Alayash AI, Schaffner A. CD163 is the macrophage scavenger receptor for native and chemically modified hemoglobins in the absence of haptoglobin. *Blood* 2006 Jan;107(1):373-380.

Schenk M, Krutzik SR, Sieling PA, Lee DJ, Teles RMB, Ochoa MT, et al. NOD2 triggers an interleukin-32-dependent human dendritic cell program in leprosy. *Nat Med* 2012;18:555–563.

Schuenemann VJ, Mendum TA, Krause-Kyora B, Jäger G, Bos KI, Herbig A, Economou C, et al. Genome-Wide Comparison of Medieval and Modern *Mycobacterium leprae*. *Science* 2103 Jul;341(6142):179-83.

Schuring RP, Hamann L, Faber WR, Pahan, D., Richardus, et al. Polymorphism N248S in the human Toll-like receptor 1 gene is related to leprosy and leprosy reactions. *JID* 2009;199:1816-1819.

Schurr E, Alcais A, Singh M, Mehra N, Abel L. Mycobacterial infections: PARK2 and PACRG associations in leprosy. *Journal compilation* 2007;69(1);231–233.

Scollard DM, Joyce MP, Gillis TP. Development of leprosy and type 1 leprosy reactions after treatment with infliximab: a report of 2 cases. *Clin Infect Dis* 2006 Jul;43(2):e19-22.

Sharma R, Lahiri R, Scollard DM, Pena M, Williams DL, Adams LB, et al. The armadillo: a model for the neuropathy of leprosy and potentially other neurodegenerative diseases. *Dis Model Mech* 2013;6(1):19-24.

Shepard CC. Multiplication of *Mycobacterium leprae* in the foot-pad of the mouse. *Int J Lepr* 1962;30:291-306.

Shin D, Yuk J, Lee H, Lee S, Son JW, Harding CV, et al. Mycobacterial lipoprotein activates autophagy via TLR2/1/CD14

and a functional vitamin D receptor signaling. *Cell Microbiol* 2010 Nov;12(11):1648-1665.

Siddiqui MR, Meisner S, Tosh K, Balakrishnan K, Ghei S, Fisher SE, Golding M, Shanker, et al. A major susceptibility locus for leprosy in India maps to chromosome 10p13. *Nature Genet* 2001;27:439–441.

Silva GAV, Naveca FG, Ramasawmy R, Boechat AL. Association between the IFNG +874A/T gene polymorphism and leprosy resistance: A meta-analysis. *Cytokine* 2014;65:130–133.

Singh P & Cole ST. *Mycobacterium leprae*: genes, pseudogenes and genetic diversity. *Future Microbiol.* 2011 January;6(1): 57–71.

Souza MM, Netto EM, Nakatani M, Duthie MS. Utility of recombinant proteins LID-1 and PADL in screening for *Mycobacterium leprae* infection and leprosy. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2014 Aug; 108(8):495-501.

Sapan CV, Lundblad RL, Price NC. Colorimetric protein assay techniques. *Biotechnol Appl Biochem* 1999;29:99–108.

Spencer JS & Brennan PJ. The role of *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid I (PGL-I) in serodiagnosis and in the pathogenesis of leprosy. *Lepr Rev* 2011 Dec;82(4):344-57.

Stefani MM, Guerra JG, Sousa AL, Costa MB, Oliveira ML, Martelli CT, Scollard DM 2009. Potential plasma markers of type 1 and type 2 leprosy reactions: a preliminary report. *BMC Infect Dis* 9: 75

Strachan T, Read AP. Mapeamento genético de caracteres complexos. Em: *Genética Molecular Humana*. 2. ed. São Paulo: ArtMed. 2002. p. 283-93.

Sulahian TH, Högger P, Wahner AE, Wardwell K, Goulding NJ, Sorg C, Droste A, Stehling M, Wallace PK, Morganelli PM, Guyre PM. Human monocytes express CD163, which is upregulated by IL-10 and identical to p155. *Cytokine*.2000 Sep;12(9):1312-21.

Suryadevara NC, Sanjee NV, Vijaya LV, Jain S & Anandraj MPJS. Association of GT microsatellite polymorphism in TLR 2 gene with leprosy. *BMC Infect Dis* 2012, 12(1):P12.

Tani K, Funifl H, Nagatas S, Miwa S. Human liver type pYRIvate kinase: Complete amino acid sequence and the expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci* 1988;85:1792-1795.

Tayles N, Buckley HR. Leprosy and tuberculosis in Iron Age Southeast Asia? *Am Journal Phys Anthropol* 2004;125(3): 239–256.

Thein SL. The molecular basis of β -thalassemia. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013 May 1;3(5):a011700.

Thom CS, Dickson CF, Gell DA, Weiss MJ. Hemoglobin Variants: Biochemical Properties and Clinical Correlates. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013;3:a011858.

Thye T, FO Vannberg, Wong SH, Owusu-Dabo E, Osei I, Gyapong J, et al. Genome-wide association analyses identifies a susceptibility locus for tuberculosis on chromosome 18q11.2. *Nat Genet* 2010 Sep;42(9):739-41.

Truman RW, Krahenbuhl JL. Viable *M. leprae* as a research reagent. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 2001 Mar;69(1):1-12.

Truman RW. Leprosy in wild armadillos. *Lepr Rev* 2005;76, 198–208.

Truman RW, Singh P, Sharma R, Busso P, Rougemont J, Paniz-Mondolfi A, Kapopoulou A, Brisse S, Scollard DM, Gillis TP, Cole ST. Probable Zoonotic Leprosy in the Southern United States. *N Engl J Med* 2011;364: 1626-33.

Tsutsumi H, Tani Kenzaburo, Fujli H, Miwa S. Expression of L- and M-Type PYRivate Kinase in Human Tissues. *Genomics*1988;2:86-89.

Tullius MV, Harmstonb CA, Owensb CP, Chimb N, Morseb RP, McMathb LM, Iniguez A, Kimmeya JM, Sawayac MR, Whitelegged JP , Horwitza MA & Gouldingb CW. Discovery and characterization of a unique mycobacterial heme acquisition system *PNAS* 2011;108(12):5051–5056.

Valentine WN, Tanaka KM, Miwa S. A specific erythrocyte glycolytic enzyme defect (pYRivate kinase) in three subjects with congenital non-spherocytic hemolytic anemia. *Trans Assoc Am Physicians* 1961;74:100-10.

Vanarsa K, Ye Y, Han J, Xie C, Mohan C, Wu T. Inflammation associated anemia and ferritin as disease markers in SLE. *Arthritis Res Ther* 2012 Aug 7;14(4):R182.

Vanderborght PR, Pacheco AG, Moraes ME, Antoni G, Romero M, Verville A, Thai VH, Huong NT, Ba NN, Schurr E, Sarno EN, Moraes MO. HLA-DRB1*04 and DRB1*10 are associated with resistance and susceptibility, respectively, in Brazilian and Vietnamese leprosy patients. *Genes and Immunity* 2007;8:320-324.

van Oirschot BA, Francois JJ, van Solinge WW, van Wesel AC, Rijksen G, van Amstel HK, van Wijk R. Novel type of red blood cell pYRivate kinase hyperactivity predicts a remote regulatory locus involved in PKLR gene expression. *Am J Hematol* 2014 Apr;89(4):380-4.

van Wijk R, van Solinge WW. The energy-less red blood cell is lost: erythrocyte enzyme abnormalities of glycolysis. *Blood* 2005 Dec;106(13):4034-42.

Verway M, Behr MA, White JH 2010. Vitamin D, NOD2, autophagy and Crohn's disease. *Expert Rev Clin Immunol* 6:505-508.

Vries RRP, Mehra NK, Vaidya MC, Gupte MD, Khan PM, Rood JJV. HLA -linked Control of Susceptibility to Tuberculoid Leprosy and Association with HLA-DR types. *Tissue Antigens* 1980;16:294-304.

Walker SL, Roberts CH, Atkinson SE, Khadge S, Macdonald M, Neupane KD, Ranjit C, Sapkota BR, Dhakal S, Hawksworth RA, Mahat K, Ruchal S, Hamal S, Hagge DA, Lockwood DN 2012.

Wheeler PR. Recent research into the physiology of *Mycobacterium leprae*. *Adv Microb Physiol* 1990;31:71-124.

Wong SH, Gochhait S, Malhotra D, Pettersson FH, Teo YY, Khor CC, et al. Leprosy and the adaptation of human toll-like receptor 1. *PLoS Pathog* 2010;6:e1000979.

Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, Weinberg K, Rea TH, Bloom BR, et al. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science*. 1991 Oct;254(5029):277-79.

Zanella A, Berzuini MB, Guffanti A, Lecchi L, Poli F, Cappellini MD, Barosi G. Iron status in red cell pyruvate kinase deficiency: study of Italian cases. *Br J Haematol* 1993 Mar;83(3):485-90.

Zanella A, P Bianchi. Red cell pyruvate kinase deficiency: from genetics to clinical manifestations. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 2000 Mar;13(1):57-81.

Zanella A, Bianchi P, Iurlo A, Boschetti C, Taioli E, Vercellati C, et al. Iron status and HFE genotype in erythrocyte pYRIvate kinase deficiency: study of Italian cases. *Blood Cells Mol Dis* 2001;27(3):653-61.

Zanella A, Fermo E, Bianchi P, Valentini G. Red cell pYRIvate kinase deficiency: molecular and clinical aspects. *Br J Haematol* 2005;130(1):11-25.

Zanella A, Bianchi P, Fermo E. PYRIvate Kinase Deficiency. *Haematologica* 2007;92:721-723.

Zhang FR, Huang W, Chen S, Sun L, Liu H, Li Y, Cui Y, et al. Genome-wide association study of leprosy. *N Engl J Med* 2009;361(27):2609-2618.

9. ANEXOS

Anexo 1 - Mapa de LD nas populações CEU e YRI

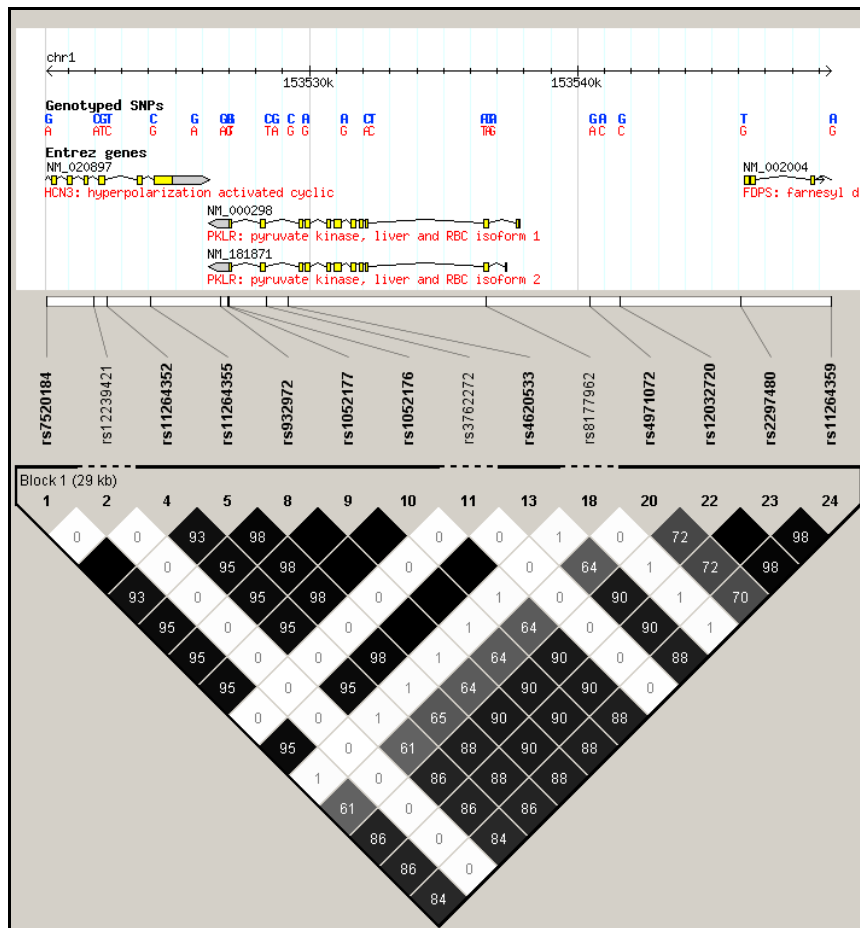


Figura 9.1 - Mapa de LD na população CEU (HapMap). Uma escala de branco até preto pode ser observado: branco – LD fraco ($r^2 < 50$); cinza – LD moderado fraco ($50 < r^2 < 80$) e preto – LD forte ($r^2 > 80$). Os losangos pretos sem numeração representam $r^2 = 100$.

O mapa de LD da população de descendência europeia apresenta um bloco de SNPs majoritário (representado pelo plot completo), embora alguns subagrupamentos que estão em forte desequilíbrio entre os SNPs possam ser observados (Figura 1). No mapa de LD da população africana observa-se maior número de SNPs na região, sendo que a maioria não se encontra em desequilíbrio de ligação (Figura 2). Um bloco formado pelos SNPs rs932972, rs1052176 e rs1052176 com forte LD é visualizado.



Figura 9.2 - Mapa de LD da população YRI (HapMap). Uma escala de branco até preto pode ser observado: branco – LD fraco ($r^2 < 50$); cinza – LD moderado fraco ($50 < r^2 < 80$) e preto – LD forte ($r^2 > 80$). Os losangos pretos sem numeração representam $r^2 = 100$.

A seleção dos SNPs candidatos partiu do princípio da escolha de SNPs que não apresentaram forte LD com os SNPs rs11264355 e rs11264359, que foram anteriormente estudados. Essa estratégia baseou-se na tentativa de desvendar a existência de outro “tag SNP” que poderia estar associado à hanseníase de forma independente, capturando a informação genética de outra região do *PKLR*. Logo, a população africana (YRI) foi utilizada como base na seleção dos SNPs, dentre os quais aqueles que não se encontraram com forte desequilíbrio com o SNP rs11264355 e rs11264359 foram selecionados.

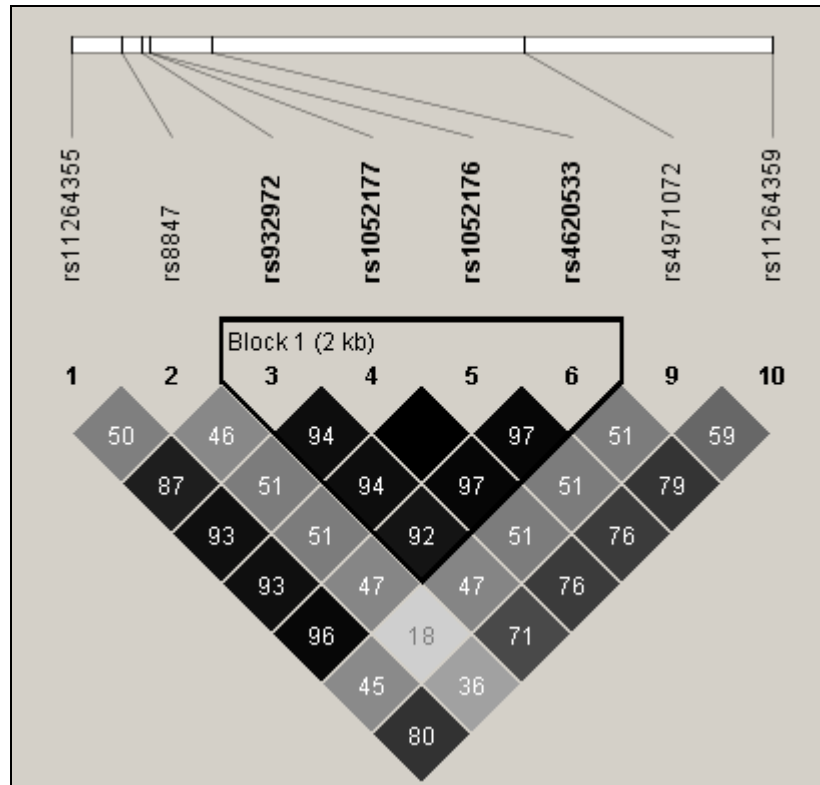


Figura 9.3 - Mapa de LD da população do Rio de Janeiro. Os dados do sequenciamento e do PCR em Tempo Real foram utilizados para a construção desse mapa. N=80 indivíduos. Uma escala de branco até preto pode ser observado: branco – LD fraco ($r^2 < 50$); cinza – LD moderado fraco ($50 < r^2 < 80$) e preto – LD forte ($r^2 > 80$).



CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE
COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER Nº 170/2012

Registro CONEP 16836 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

FR – 330647

Processo nº 25000.020639/2012-84

Projeto de Pesquisa: *“Identificação de biomarcadores de resposta inata e adaptativa na hanseníase e das reações hansênicas por uma nova abordagem funcional e transcricional”.*

Pesquisador Responsável: Euzenir Nunes Sarno

Instituição: Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ (**CENTRO ÚNICO**)

CEP de origem: Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/IOC

Área Temática Especial: Pesquisa com cooperação estrangeira

Patrocinador: CNPq, FAPERJ e Fundo Nacional de Saúde

Sumário geral do protocolo

Introdução: Não foi apresentada uma introdução no projeto.

Objetivos: O objetivo geral da nossa proposta é identificar novos sinais biomarcadores no prognóstico e/ou diagnóstico precoce das reações da hanseníase. Nossa hipótese geral é que fatores inatos e adaptativos sejam os principais determinantes das reações inflamatórias da hanseníase.

Objetivos específicos: Identificar a expressão diferencial de genes imunorregulatórios inatos e adaptativos associados com o controle da infecção pelo *M. leprae* versus a doença e determinar a expressão de assinaturas genéticas dos fenótipos da hanseníase; Identificar a expressão diferencial de genes imunorregulatórios inatos e adaptativos associados com o controle da infecção pelo *M. leprae* versus a doença e determinar a expressão de assinaturas genéticas das reações; Identificar a expressão diferencial de genes imunorregulatórios inatos e adaptativos associados com o desenvolvimento das reações da hanseníase (antes, durante e depois) e determinar a expressão de assinaturas genéticas que possam predizer ou identificar a reação em um estágio precoce e o resultado desses estudos irá permitir a identificação de novos biomarcadores e assinaturas biomarcadoras precoces ao diagnóstico e/ou prognóstico dos episódios reacionais. Isso não é somente extremamente importante para o controle, mas também poderá revelar novos alvos para intervenção nos danos teciduais mediados pela resposta imune.

Desenho do estudo: Trata-se de um estudo nacional e unicêntrico.

Métodos: Uma vez que estamos tentando identificar fortes marcadores que irão discriminar significativamente os diferentes grupos de pacientes com hanseníase desse estudo, vamos começar com a inclusão de grupos de 15: **Tópico 1:** 15 TT/BT; 15 LL/BL; 15 HHC; 15 EC (n=60); **Tópico 2:** 15 RR; 15 ENL (n=30) e **Tópico 3:** 15 RR (antes e depois da terapia anti-reacional) (n=30) 15 ENL (antes e depois da terapia anti-reacional) (n=30). Total 150 amostras de sangue.

O monitoramento clínico para os primeiros sinais de reação da hanseníase será realizado durante as visitas mensais à clínica e será realizado por clínicos experientes, profissionais de saúde e as informações do paciente serão anotadas em um formulário

Anexo 3

Projeto: Identificação de biomarcadores da Hanseníase e Reação Hansênica

Número do paciente: BioRx03- _____

Por favor, dedique um tempo para ler cuidadosamente as informações a seguir e também para ouvir as explicações fornecidas pelo investigador. Sinta-se livre para perguntar sobre qualquer ponto que não estiver claro ou se quiser receber mais informações. Leve o tempo que for necessário para decidir se deseja ou não participar do estudo.

Termo de consentimento livre e esclarecido

Eu _____
fui convidado a participar do projeto De Pesquisa: “Identificação de biomarcadores inatos e adaptativos da hanseníase e das reações por uma nova abordagem funcional e transcricional”, com duração entre 2013-2016.

Informações sobre o estudo:

Você está sendo convidado a participar de um estudo clínico com o objetivo de identificar moléculas que possam funcionar como biomarcadoras de reação da hanseníase. Para que você possa tomar a decisão de participar ou não deste estudo, é necessário que saiba que nenhum dado pessoal será informado, tal como seu nome e/ou endereço residencial. Se você resolver participar, será solicitado que você assine este formulário de consentimento informado. Você receberá uma cópia deste documento assinado para seu arquivo.

Caso você concorde em participar do estudo, uma amostra de sangue adicional (20 mL), além da que já é coletada para os testes de rotina (10 mL), será obtida no diagnóstico e, ao término do tratamento prescrito pelo médico responsável. A coleta de sangue será realizada no próprio Ambulatório Souza Araújo, pelos enfermeiros responsáveis pelo setor de procedimentos e exames. Caso você desenvolva algum episódio reacional ao longo do tratamento, precisaremos coletar uma amostra na ocasião do diagnóstico. Uma parte da amostra (soro), que é obtido como rotina do Ambulatório Souza Araújo, poderá ser armazenada em caso de precisar repetir a medida ou realizar outro teste relacionado ao estudo. Se você não concordar com esse segundo teste você poderá dizer agora e o teste não será realizado. Se você concordar agora nós não iremos obter sua permissão de novo para obter um segundo teste na sua amostra em uma data tardia.

O sangue será coletado da veia em seu braço. Seu sangue será misturado com reagentes especiais e a medida da resposta imune irá nos ajudar a identificar hanseníase. Nós ficaremos felizes em responder suas perguntas relacionadas sobre a doença e nosso estudo, e também fornecer os resultados dos nossos testes laboratoriais e quando eles estarão disponíveis. Você está livre para aceitar ou rejeitar nossa proposta para

participar desse estudo, e você pode também alterar o seu consentimento em qualquer etapa do estudo. Os resultados serão analisados para prever reações hansênicas.

Confidencialidade

Os resultados obtidos desse estudo me serão informados e considerados confidenciais, podendo, no entanto, serem divulgados na forma de comunicação científica, mas não será permitida a identificação pessoal do voluntário do projeto, o que garante a privacidade.

Benefícios

Fui informado que os resultados desse estudo poderão me beneficiar, pois poderá permitir maior conhecimento relativo ao diagnóstico e tratamento da reação hansênica. Independentemente da participação no estudo, o atendimento será o mesmo no Ambulatório Souza Araújo.

Riscos e Desconfortos

Não há nenhum prejuízo para o voluntário, além de dor momentânea e uma chance reduzida de inchaço no local de inserção da agulha. Para minimizar a chance de infecção, serão utilizados materiais estéreis e serão tomados os devidos cuidados.

O profissional responsável me explicou o conteúdo dessas informações e se colocou à disposição para responder as minhas perguntas sempre que eu tiver novas dúvidas. Tenho também a liberdade de consultar outros investigadores envolvidos neste estudo quando sentir necessidade. Minha participação é inteiramente voluntária e espontânea. Fui informado de que posso a qualquer momento desistir de participar do estudo sem prejuízo para meu tratamento e acompanhamento.

Também fui informado que poderei esclarecer qualquer dúvida quanto a este estudo com a Dra. Euzenir Nunes Sarno, no Laboratório de Hanseníase do IOC ou pelos telefones 2562-1527/2562-1531.

Recebi uma cópia desse termo de consentimento e pela presente aceito voluntariamente em participar deste estudo permitindo, portanto que os procedimentos acima relatados sejam realizados na minha pessoa.

Rio de Janeiro / /

Assinatura do paciente: _____

Nome em letra de forma: _____



REPÚBLICA DE MOÇAMBIQUE

MINISTÉRIO DA SAÚDE

COMITÉ NACIONAL DE BIOÉTICA PARA A SAÚDE
IRB00002657

Exmo Senhor
Dr. Nédio Jonas Mabunda
INS- Departamento de Imunologia

Ref: 140/CNBS/11

Data 24 de Maio de 2011

Assunto: *aprovação do protocolo "Estudo de polimorfismo de citocinas, PKLR, LTA4H e associação com a Tuberculose."*

O Comité Nacional de Bioética para a Saúde (CNBS) analisou as correções efetuadas no protocolo intitulado: "**Estudo de polimorfismo de citocinas, PKLR, LTA4H e associação com a Tuberculose.**" Sobre o mesmo chegou a seguinte conclusão:

O CNBS não vê nenhum inconveniente do ordenamento ético que impeça a realização do estudo pelo que, dá a sua devida aprovação.

Contudo, recomenda os investigadores que o mantenham informado do decurso do estudo.

Faz notar que a aprovação ética não substitui a autorização administrativa.

Sem mais de momento as nossas cordiais saudações.



ENDEREÇO:
MINISTÉRIO DA SAÚDE
CORRAL 75
Av. Eduardo Mondlane/Santuário da Saúde
MAPUTO - MOÇAMBIQUE

Telefones: 490814417/2/3/4
Tels: 5 219 5183/1/4/5
FAX: 218 311 426/47
355 11 55529

Anexo 5

MINISTÉRIO DA SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE
DEPARTAMENTO DE IMUNOLOGIA

Estudo de Polimorfismo de Citocinas, PKLR, LTA4H e associação com a Tuberculose

Eu confirmo que li e entendi a informação do participante, que explica os objectivos e a natureza do estudo e possíveis riscos, e estes foram detalhadamente explicados.

1. Antes de assinar a folha de Consentimento informado, eu tive a oportunidade de pensar sobre a minha participação e de fazer as perguntas relacionadas com possíveis danos físicos ou mentais que poderei vir a sofrer como resultado da participação e recebi respostas satisfatórias.
2. Eu entendo que a minha participação é voluntária e que eu sou livre para desistir a qualquer momento, por qualquer razão sem que a minha relação com o hospital seja afectada.
3. Eu entendo que as informações sobre a minha história, colhidas durante o estudo, poderão ser consultadas por pesquisadores associados, autoridades de vigilância sanitária e epidemiológica.
4. Eu dou minha permissão para que os dados desta pesquisa sejam publicados sem que minha identificação seja divulgada.
5. Eu entendo que caso tenha qualquer dúvida relacionada com a minha participação nesta pesquisa, deverei entrar em contacto com o Nédio Mabunda ou Hélder Rafael pelo telefone (21)309317.
6. Eu declaro que recebi uma cópia da folha do consentimento informado e da folha de informação do participante, e eu concordo em participar neste estudo.

Nome do paciente	Data
_____	__/__/2011
Nome da pessoa que colhe o consentimento	Data
_____	__/__/2011
Pesquisador	Data
_____	__/__/2011